

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR NEUROCHIRURGIE  
PROF. DR. ALEXANDER BRAWANSKI  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**- PEDF und seine Auswirkungen auf die  
Proliferation und Differenzierung von neuronalen  
Stammzellen in der Subventrikulärzone und im  
Hippocampus im adulten Nagergehirn-**

Inaugural-Dissertation  
Zur Erlangung des Doktorgrads  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Gerhard Michael Ertl

2009

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Alexander Brawanski

2. Berichtserstatter:

PD Dr. Felix Schlachetzki

Tag der mündlichen Prüfung:

11. März 2009

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>A. ALLGEMEINER TEIL .....</b>	<b>4</b>
1. Vorbemerkung .....	4
2. Ein kurzer Überblick über den Begriff „Neurogenese“ .....	5
3. Neurogenese im Gehirn adulter Säuger – .....	6
Neue Erkenntnisse aus dem letzten Jahrzehnt .....	6
a) Neurogenese in der SVZ und Faktoren, die diese beeinflussen .....	6
b) Neurogenese im Hippocampus und Faktoren, die diese beeinflussen .....	8
4. VEGF – ein Faktor mit großem Einfluss auf die Neurogenese .....	9
5. PEDF – Struktur und Funktion .....	12
a) Vorkommen und allgemeine Strukturmerkmale .....	12
b) PEDF als neuroprotektiver und antiangiogenetischer Faktor .....	13
c) PEDF und Tumore .....	16
6. Das Gleichgewicht von VEGF und PEDF .....	18
<b>B. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG .....</b>	<b>19</b>
1. Allgemeine Fragestellung .....	19
2. Spezielle Fragestellungen .....	19
3. Strategie zum Nachweis neu entstandener Neurone .....	20
I. Nachweis der Zellproliferation - BrdU .....	20
II. Nachweis einzelner Differenzierungsschritte .....	21
<b>C. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
1. Versuchstiere .....	23
2. Implantation der Pumpen .....	23
3. Applikation von BrdU .....	24
4. Versuchsaufbau .....	25
5. Aufbereitung der Gehirne .....	26
a) Perfusion.....	26
b) Schneiden der Gehirne .....	26
6. Immunhistochemie .....	27
a) BrdU .....	27
b) DCX .....	28
7. Immunfluoreszenz .....	29
a) Doppelfärbung: BrdU/ TUJ-1 .....	29
b) Doppelfärbung BrdU/GFAP .....	30
8. Stereologiesystem .....	30

<b>9. Konfokales Mikroskop</b>	<b>31</b>
<b>10. Auswertung der Daten</b>	<b>32</b>
a) Eigene Methoden.....	32
b) Darstellung der Daten und Statistik .....	32
<b>D. ERGEBNISSE.....</b>	<b>34</b>
<b>Immunhistochemie und Immunfluoreszenz</b>	<b>34</b>
a) Subventrikulärzone (SVZ) .....	34
b) Hippocampus .....	41
<b>E. DISKUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>46</b>
<b>2. Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den vorangegangenen <i>in vitro</i> Versuchen</b>	<b>46</b>
a) Neurogenese .....	46
b) Differenzierung .....	47
<b>3. Auswirkungen des Wachstumsfaktors PEDF auf die Neurogenese und Differenzierung</b>	<b>48</b>
a) in der Subventrikulärzone .....	48
b) im Hippocampus .....	51
<b>4. Auswirkungen des Wachstumsfaktors VEGF auf die Neurogenese und Differenzierung</b>	<b>54</b>
a) in der Subventrikulärzone .....	54
b) im Hippocampus .....	56
<b>5. VEGF und PEDF – gemeinsame Effekte auf Neurogenese und Differenzierung</b>	<b>57</b>
a) in der Subventrikulärzone .....	57
b) im Hippocampus .....	58
<b>6. Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für die Neurowissenschaften</b>	<b>62</b>
<b>F. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>64</b>
<b>G. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>H. ANHANG .....</b>	<b>72</b>
<b>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</b>	<b>72</b>
<b>Danksagungen</b>	<b>73</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>74</b>



# A. Allgemeiner Teil

## 1. Vorbemerkung

Bis zum Ende des letzten Jahrhunderts war man sich in der Wissenschaft einig, dass im ZNS nach der Embryonalperiode keine Neubildung von Neuronen mehr stattfindet (Taupin, 2005). Vor einem Jahrzehnt wurden allerdings gleich zwei Regionen im Säugerhirn entdeckt, in denen zeitlebens, d.h. auch im adulten Gehirn zu einer stetigen Neurogenese kommt: die **Subventrikulärzone (SVZ)** in der lateralen Wand der Seitenventrikel und die **Subgranulärschicht (SGS)** im Gyrus dentatus des Hippocampus. Außerdem wurden weitere Regionen mit denselben Eigenschaften gefunden, jedoch mit deutlich geringer ausgeprägter Neurogeneseaktivität (Gould, 2007). Die Fähigkeit des Gehirns zur Regeneration durch Nervenzellneubildung und deren Differenzierung (*zelluläre Plastizität*) z.B. nach Schädel-Hirn Trauma oder Schlaganfall ist allerdings limitiert. Zusammen mit der eingeschränkten *funktionellen* und *strukturellen Plastizität* hat es zur Folge, dass sich die klinische Symptomatik der betroffenen Patienten auch nach längerer Zeit oft nicht entscheidend verbessert. Unter funktioneller Plastizität versteht man, dass andere Regionen im Gehirn Funktionen geschädigter Areale übernehmen, während von struktureller Plastizität dann gesprochen wird, wenn dies durch die Aussprossung neuer Nervenzellfortsätze und deren neuronaler Verknüpfung geschieht. Hierbei können Regionen ganz in der Nähe der Läsion, beispielsweise bei einem ischämischen Insult, oder auch kontralaterale Areale (Aktivierung des rechten Broca-Areals nach Zerstörung des linken) durch rehabilitative Maßnahmen die Aufgaben der zerstörten Regionen ganz oder teilweise übernehmen. (Duffau, 2006).

Ziel der Forschung war es also Faktoren zu entdecken und zu untersuchen, die die Regeneration und Differenzierung von neuronalen Stammzellen beeinflussen, um damit auch neurodegenerative Erkrankungen wie den Morbus Parkinson therapieren zu können. Hierbei traten allerdings folgende Probleme auf:

Wie kann man z.B. durch den Einsatz der richtigen Kombination von Wachstumsfaktoren eine ausreichende Zahl von richtig differenzierten Neuronen generieren und diese zum Ort des eigentlichen Defekts dirigieren? Schließlich liegen die genannten Quellen neuronaler Stammzellen und die Orte, an denen sie benötigt werden, oft weit auseinander.

Die grundlegende Thematik dieser Dissertation besteht darin zu untersuchen, wie sich einer dieser Wachstumsfaktoren, **Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF)**, auf die Regeneration und Differenzierung neuronaler Stammzellen auswirkt.

## 2. Ein kurzer Überblick über den Begriff „Neurogenese“

Relativ früh in der Embryonalentwicklung findet ein Vorgang statt, der für die Entstehung des zentralen und peripheren Nervensystems unerlässlich ist. Das Mesoderm der Chorda dorsalis induziert die Invagination eines Teils des Ektoderms in den Embryo, wodurch das *Neuralrohr* entsteht. Von dort aus entwickelt sich das ZNS. Dabei entstehen die Neuronen und die zentrale Glia aus dem Neuralepithel, hingegen entwickelt sich das Bindegewebe aus mesenchymalen Zellen (Trepel, 2004).

Grundsätzlich kann man die Neurogenese in zwei Abschnitte einteilen:

Während der *Proliferation* vervielfältigen sich *neuronale Vorläuferzellen* – die sog. *Neuroblasten* – und wandern danach zu ihrer letztendlichen Position im ZNS, wo sie sich differenzieren und somit ihre speziellen funktionellen Charakteristika entwickeln. Auf diese Migration wird in der weiteren Diskussion über adulte Neurogenese später eingegangen.

Nachfolgend kommt es zur sog. *Maturation*, einem Bestandteil des Differenzierungsvorgangs: hierbei fangen die Axone an sog. Wachstumskegeln an auszusprossen, die Dendriten wachsen und synaptische Kontakte kommen zustande. Mit diesen Vorgängen bereitet sich das Neuron auf seine spätere Funktion im neuronalen Netzwerk vor. In jedem dieser Abschnitte spielen Wachstumsfaktoren als Stimulatoren und Inhibitoren eine entscheidende Rolle (Trepel, 2004). Am rostralen Ende des Neuralrohrs entwickelt sich das Gehirn. Durch komplizierte Verdrehungen entwickeln sich dabei ganz bestimmte, flüssigkeitsgefüllte Kompartimente, die so genannten Ventrikel. Um diesen Bereich herum entstehen alle neuen Zellen während der Entwicklung des Gehirns und es handelt sich ebenfalls, wie oben bereits erwähnt, um eine der wichtigsten Quellen der Neurogenese im Erwachsenenalter.

Weiterhin werden einige Begriffe, die im Folgenden immer wieder verwendet werden, definiert:

Jede Zelle im Organismus hat ihren Ursprung in einer *Stammzelle*. Diese Zelle hat die einzigartige Eigenschaft, sich in fast alle Richtungen entwickeln zu können. Deshalb nennt man eine solche Zelle **multipotent**. Die Teilung dieser Zelle führt zur Entstehung mindestens einer Zelle von derselben Art, was bedeutet, dass sie sich wiederum selbst erneuern kann. Diese Eigenschaft bleibt über einen langen Zeitraum erhalten. Dabei ist zu bemerken, dass neuronale Stammzellen die somatischen Stammzellen mit der höchsten Plastizität zu sein scheinen, weil sie einen Beitrag zu allen drei Keimblättern liefern (Clarke et al., 2000).

Eine *Progenitor-* oder *Vorläuferzelle* hat im Gegensatz dazu nur die Möglichkeit, sich in eine begrenzte Anzahl von Zelllinien zu entwickeln. Ebenfalls ist ihre Fähigkeit zur

Selbsterneuerung stark eingeschränkt weswegen sie als **unipotent** bezeichnet werden (Potten and Loeffler, 1990).

Als *spezialisierte* Zellen werden solche bezeichnet, die bereits ein großes Spektrum an speziellen Charakteristika entwickelt haben (also sehr differenziert sind) und sich nicht mehr teilen können. Zu solchen Zellen gehören unter anderem auch Neurone.

### 3. Neurogenese im Gehirn adulter Säuger – Neue Erkenntnisse aus dem letzten Jahrzehnt

Ramón y Cajal stellte 1928 das lange gültige Dogma auf, dass Nervenzellfortsätze im ZNS des Erwachsenen nicht die Fähigkeit hätten, sich zu regenerieren (Ramón y Cajal, 1928). Obwohl Altmann und Kollegen entdeckten, dass Neurogenese im Hippocampus (Altman and Das, 1965) und im Bulbus olfactorius (Altman, 1969) stattfindet, wurden diese Erkenntnisse zurückgewiesen, da es zu dieser Zeit noch an neuronenspezifischen immunhistochemischen Markern mangelte.

Erst im letzten Jahrzehnt des 20. Jahrhunderts konnte das Vorkommen adulter Neurogenese in der Subventrikulärzone (Lois et al., 1993) und in der Subgranulärschicht des Gyrus dentatus im Hippocampus (Cameron et al., 1993 / Kuhn et al., 1996) glaubhaft nachgewiesen werden.

#### **a) Neurogenese in der SVZ und Faktoren, die diese beeinflussen**

Die SVZ ist eine proliferative Matrix für neuronale Stammzellen, was zur Vermutung führte, dass es sich hier um ein Rudiment der embryonalen Neurogenese handeln könnte. Diese Region besteht hauptsächlich aus vier Schichten: vom Lumen des Ventrikels her betrachtet gibt es zunächst die Schicht der Ependymzellen, gefolgt von den Neuroblasten in der subependymalen Schicht, die von Astrozyten und *Transitory Amplifying Progenitor* (TAP) Zellen umgeben sind, welche die sich auch zwischen den Ketten der Neuroblasten befinden (Doetsch et al., 1997). Mit Hilfe des Zellproliferationsmarkers Bromodeoxyuridin (BrdU), der sich anstatt Thymidin in neu entstehende DNA integriert, konnte außerdem nachgewiesen werden, dass sich die neuronalen Vorläuferzellen der Subependymalschicht von ihrem Ursprungsort entlang dem rostralen Migrationsstrang (RMS) (Rousselot et al., 1995) zum Bulbus olfactorius bewegten. Dort differenzieren sie sich zu Interneuronen (Alvarez-Buylla et al., 1994) (*Abb. 1*).

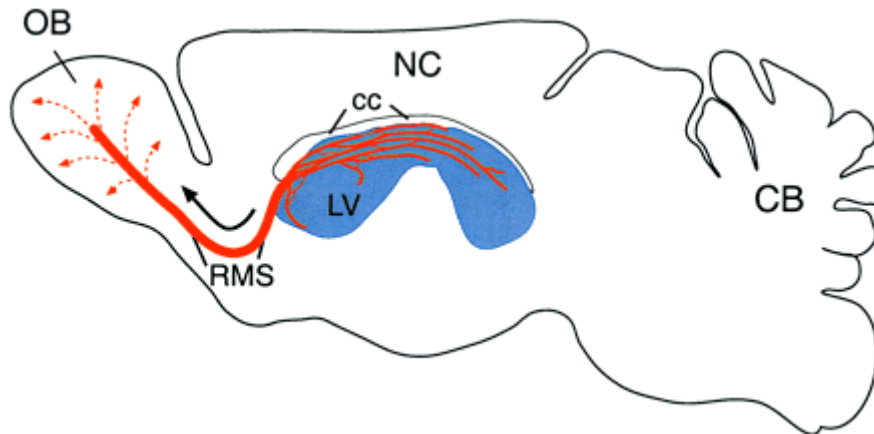
Eine weitere Klassifikation dieser Zellen wurde von Alvarez-Buylla und Kollegen (Alvarez-Buylla et al., 2002) vorgenommen: Stammzellen (Typ B Zellen) mit der Eigenschaft langer Zellzyklen und positiver Anfärbbarkeit für *Glial Fibrillar Acidic Protein* (GFAP, ein Protein,

das überwiegend von Astrozyten exprimiert wird), die sich schnell teilenden *Transitory Amplifying Neural Progenitors* (Typ C Zellen, diese entstehen aus den Typ B Zellen) und die Typ A Zellen, die sich aus den Typ C Zellen entwickeln und in den Bulbus olfactorius wandern. Dieser Vorgang findet neben der SVZ auch im Hippocampus statt, wo bestimmte Zellen, die sowohl morphologisch als auch durch die Expression von GFAP Astrozyten sehr ähnlich sind (Seri et al. 2001).

Unklar ist dabei, welche der Zellen in der SVZ tatsächlich als Stammzellen zu bezeichnen sind. So gibt es Experimente, die den Ependymzellen selbst diese Funktion zuzuschreiben. Dabei wurde eine spezielle Färbetechnik verwandt, die nur Zellen der ependymalen Zelllinie markiert, die in der Lage waren Neurosphären, also Gruppen von neuronalen Vorläuferzellen *in vitro* zu bilden. Aus diesen konnten dann wieder Neurone, radiäre Glia (in der Nähe des kulturellen Zellclusters) und Astrozyten (in der Peripherie) hervorgehen. Dabei konnten alle Attribute von Stammzellen herausgestellt werden: die Zellen waren selbsterneuernd und multipotent (Mokry et al., 1995). Andere Publikationen wiesen darauf hin, dass es sich bei den neuronalen Stammzellen um eine Subgruppe von Astrozyten handeln könnte: selektiv markierte Zellen, die in den Bulbus olfactorius migriert sind, zeigten morphologische Ähnlichkeiten zu Astrozyten und exprimierten den astrozytären Marker GFAP (Doetsch et al., 1999). Insgesamt ist diese Frage der Identität von Stammzellen in der SVZ bis zu diesem Zeitpunkt nicht zufriedenstellend beantwortet, was vor allem am Mangel von hochspezifischen Markern liegen dürfte.

Mittlerweile sind bereits einige Wachstumsfaktoren bekannt, die den Prozess der Neurogenese und Differenzierung beeinflussen: *Epidermal Growth Factor (EGF)* und *basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)* zählen zu den potentesten Faktoren der Stimulation neuronaler Vorläuferzellen aus der SVZ *in vitro* (Craig et al., 1996). Zudem sind EGF, *Transforming Growth Factor alpha (TGF- $\alpha$ )* und bFGF auch hinsichtlich der Neurogenese *in vivo* effektiv (Kuhn et al., 1997). Der Effekt von EGF und bFGF wurde hierbei bereits recht früh entdeckt (Reynolds et al., 1992): es konnte beobachtet werden, dass sich neuronale Stammzellen aus der SVZ *in vitro* rapide vermehrten und Neurosphären bildeten, nachdem diese beiden Faktoren dem Zellkulturmedium hinzu gegeben worden sind. Diese Zellen behielten außerdem ihre Fähigkeit sich in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren. Zur Differenzierung von Nervenzellen *in vitro* tragen hingegen Schilddrüsenhormone, Retinolsäure und andere Stoffe wie das Forskolin bei, das die intrazelluläre cAMP Konzentration über eine Aktivierung der Adenylatzyklase erhöht (Palmer et al., 1997).

Die Herstellung eines idealen Wachstumsmediums für neuronale Stammzellen und/ oder Progenitorzellen ist offensichtlich unabdingbar für die klinische Anwendbarkeit solcher Zellen. Nur so können genügend kultivierte Stammzellen erhalten werden, um sie, z.B. beim *Morbus Parkinson*, in die Regionen mit zu Grunde gegangenen Nervenzellen zu transplantieren, da sehr viele Zellen aus relativ kleinen Biopsiepräparaten der SVZ gewonnen werden müssen, um das nur 5- 20%ige Überleben der transplantierten dopaminergen Neurone *in vivo* zu kompensieren (Dunnet and Bjorklund, 1999). In einer Studie von Frank Peter Wachs aus dem Jahre 2003 konnten die besten Ergebnisse in Bezug auf die Proliferation von Stammzellen mit einer Kombination aus EGF, bFGF und NB/B27 erreicht werden. NB wird als ein Medium für den Erhalt von differenzierten Neuronen verwendet, wohingegen B27 ursprünglich zum Erhalt primärer Neuronen in Kultur angewandt wird (Wachs et al., 2003). Zusätzlich zeigten diese Vorläuferzellen die Eigenschaft der Transdifferenzierung, d.h. sie waren in der Lage sich zu hämatopoietischen Zellen zu differenzieren und sich in Gewebe von Herz, Leber und Darm zu integrieren (Clarke et al., 2000). Man könnte also schlussfolgern, dass das Milieu, in dem sich die Zellen aufhalten, einen entscheidenden Einfluss auf ihre Differenzierung ausübt.



**Abb.1:** Übersicht über den Entstehungsort und die Ausbreitung von neuronalen Stammzellen im Rattengehirn (Sagittalschnitt). OB= Bulbus olfactorius; CB= Cerebellum; LV= lateraler Ventrikel; NC= Neocortex; CC= Corpus callosum; RMS= rostral migratory stream

### **b) Neurogenese im Hippocampus und Faktoren, die diese beeinflussen**

Eine weitere Region, in der adulte Neurogenese stattfindet, ist die Subgranulärschicht im Gyrus dentatus des Hippocampus. Im Gegensatz zur SVZ wandern die neuronalen Vorläuferzellen nur eine kurze Strecke bis in die Granulärschicht um sich dort zu Granulärzellen zu differenzieren. Ähnlich wie ihre Pendants in der SVZ können auch sie in den Phänotypus von Astroglia, Oligodendroglia und Neurone übergehen (Gage et al., 1998). Die Anzahl neu entstehender Neurone nimmt mit dem Alter allerdings massiv ab (Kuhn et al.,

1996). Um dies genauer zu untersuchen, wurde ein Experiment mit jungen und alten Ratten durchgeführt, denen die Nebennierenrinde entfernt worden war. Beide Gruppen wiesen dieselbe geringe Rate an Neurogenese auf, was darauf hindeutet, dass weder eine abnehmende Zahl neuronaler Vorläuferzellen, noch ein geringeres Level molekularer Faktoren, sondern die geringe Konzentration von Kortikosteroiden für den Abfall neu entstandener Neurone im Hippocampus verantwortlich war (Cameron et al., 1999).

Außerdem scheint eine Reihe von Hormonen einen Einfluss auf die Neurogenese in dieser Region zu nehmen: ein erhöhtes Level von Stresshormonen scheint sich negativ auszuwirken (Tanapat et al., 1998), Geschlechtshormone wie Östradiol haben einen positiven über Serotonin vermittelten Effekt (Banasr et al., 2001).

Weiterhin weisen Tiere, die in einer reizreichen Umgebung leben, also z.B. Laufräder und Spielzeug zur Verfügung haben, eine weit höhere Rate an Neurogenese auf als die Tiere in der Kontrollgruppe ohne eine solche Umgebung (Kempermann et al., 1997).

Auch die neuronalen Vorläuferzellen aus dem Hippocampus sind in der Lage, sich *in vivo* zu einer Vielzahl anderer Zellen zu differenzieren, wenn sie in andere Regionen des Körpers außerhalb des Gehirns implantiert werden, allerdings nur in eingeschränkter Weise, da sie sich nicht zu Photorezeptoren entwickeln können, nachdem sie in die Retina implantiert worden sind (Nishida et al., 2000).

Wie bereits angemerkt, spielen eine ganze Reihe von Faktoren eine wichtige Rolle für die Proliferation und Differenzierung neuronaler Stammzellen. In dieser Arbeit sollen die Wachstumsfaktoren *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* und *Pigment Epithelium Derived Factor (PEDF)* hinsichtlich ihres Einflusses auf die adulte Neurogenese und die Differenzierung neuronaler Stammzellen miteinander verglichen werden.

## 4. VEGF – ein Faktor mit großem Einfluss auf die Neurogenese

Das dimere Polypeptid VEGF wurde ursprünglich eigentlich als potenter *permeabilitätsfördernder* Faktor identifiziert. 1983 wollten Senger et. al der Entstehung des malignen Aszites bei Tumoren auf den Grund gehen: sie stellten fest, dass es bei der intraperitonealen Injektion von line 10 Leberzellkarzinomzellen bei Meerschweinchen (guinea pigs) zu einer enormen Zunahme der Permeabilität der Peritonealgefäße kam. Sie versuchten daraufhin, den dafür verantwortlichen Faktor zu isolieren und fanden ein 34000 bis 42000 Dalton schweres Protein. Dieses bislang unbekannte Protein hatte bereits ab einer Dosis von

200ng dieselbe permeabilitätsfördernde Wirkung wie 1,25 µg Histamin. Dabei kam es nicht zu Endothelschäden oder Mastzelldegranulation. Eine Ähnlichkeit mit anderen permeabilitätsfördernden Faktoren wie Bradykinin, Kallikrein oder Leukokinen konnte durch entsprechende Untersuchungen ausgeschlossen werden. Diesen Effekt erzielte das damals noch als „*Vascular Permeability Factor*“ (VPF) bezeichnete Protein bereits sehr rasch (20 min post injectionem) und ohne die Vermittlung durch Histamin oder Prostaglandine (Senger et al, 1983).

Zum ersten Mal taucht der Begriff VEGF dann 1989 auf, als Ferrara und Kollegen ein Heparin-bindendes Protein aus kultivierten follikulären Hypophysenzellen des Rinds isolierten, das spezifisch vaskuläre Endothelzellen stimulierte - also *angiogenetisch* wirkte - ohne dabei einen mitogenen Effekt auf z.B. Korneaendothelzellen, Fibroblasten oder Keratinozyten zu haben. Alle bereits bekannten ähnlich wirkenden Faktoren wie bFGF oder aFGF hatten allerdings diese Effekte, woraufhin sich Ferrara et. al dazu entschlossen, das Protein auf Grund seiner einzigartigen Spezifität „vascular endothelial growth factor“ zu nennen (Ferrara et al., 1989).

Im Weiteren wurden *neurotrophe* und *neuroprotektive* Effekte von VEGF nachgewiesen (Sun et al., 2003). Eine Reihe von Experimenten wurden in der SVZ und SGZ durchgeführt, um die Auswirkungen von VEGF auf die adulte Neurogenese weiter zu untersuchen:

Jin et al. publizierten 2002 ein Experiment über den Effekt von VEGF auf neuronale Stammzellen aus dem Rattenhirn *in vitro*: sie gaben VEGF in unterschiedlichen Konzentrationen zu kultivierten Zellen aus der neuronalen Abstammung für 24h (Jin et al. 2002). Um die DNA-Replikation dieser Zellen verfolgen zu können, benutzten sie Bromodeoxyuridin (BrdU). Sie detektierten eine erhöhte Zahl BrdU- positiver Zellen (am meisten bei einer VEGF-Konzentration von 10 ng/ml), die gleichzeitig NCAM (ein Glykoprotein, das von unreifen Neuronen, aber auch von einer Reihe von anderen Zellen wie natürlichen Killerzellen, T-Zellen, Skelettmuskelzellen und verschiedenen Tumoren, wie z.B. dem Wilms-Tumor exprimiert wird) und Nestin, einen Marker für neuroepitheliale Vorläuferzellen exprimierten. Um herauszufinden, wie diese Zellen *in vivo* reagierten, schlossen sie ein weiteres Experiment an:

Mit Hilfe einer Alzet® Pumpe infundierten sie eine Lösung von aCSF (artifizieller Zerebrospinalflüssigkeit, Rate 1µl/h) allein oder mit VEGF (10ng/ml) in die Ventrikel von lebendigen Ratten für 3 Tage, wobei BrdU zweimal täglich intraperitoneal appliziert wurde. Nach einer Woche wurde das Gehirn für immunhistochemische Doppelfärbungen von BrdU mit zellspezifischen Markern für unreife Neurone (DCX), Astrozyten (GFAP) und

Endothelzellen (vWF) vorbereitet. Die Gehirne wurden geschnitten, gefärbt und danach die neu proliferierten Zellen ausgezählt. Das Ergebnis war ein deutlicher Anstieg der Proliferation von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen in den beiden Hauptregionen der Neuroproliferation SVZ und SGS im Vergleich zu den Ratten, die nur mit aCSF behandelt worden waren. Ein ähnlicher Versuchsansatz ist auch in der hier vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommen (näheres siehe Material und Methoden). Außerdem exprimierten diese Zellen den Rezeptor VEGFR2/Flk-1, der das Bindeglied zwischen VEGF und seinem positiven Effekt auf die Neurogenese zu sein scheint. Dies wurde durch die Zugabe des VEGFR2/Flk-1-Rezeptorantagonisten SU1498 nachgewiesen: in dieser Behandlungsgruppe konnte keine erhöhte Zellproliferation nachgewiesen werden. Beruht der Effekt z.B. auf einer Abnahme der Apoptose oder führt VEGF tatsächlich zu einer vermehrten Proliferation und sind Effekte im Bereich der Neurogenese mit denen auf die Angiogenese verknüpft?

In diesem Zusammenhang wirft Theo Palmer von der Neurochirurgischen Abteilung der Stanford University in einer Publikation (Palmer et al., 2000) den Begriff einer „*vaskulären Nische*“ der Neurogenese auf. Er beobachtete, dass es bei vermehrter Neurogenese gleichzeitig zu einer Vermehrung von Mikrokapillaren kam, mit denen die Vorläuferzellen in engem Kontakt stehen. So stellte er die Vermutung auf, dass Zellen mesenchymalen Ursprungs, sprich Gefäßendothelien, und andere zirkulierende Faktoren die Neurogenese im Hippocampus regulieren. Diese These wird von einem Experiment gestützt, das anhand von Studien des Gehirns von Singvögeln durchgeführt wurde: schon länger ist ja bekannt, dass es in der *higher vocal zone* (HVZ) von Singvögeln saisonal zur Atrophie und zum erneuten Entstehen von Nervenzellen kommt (Goldmann et al., 1983). Neuere Untersuchungen (Louissaint et al., 2002) in diesem Bereich haben nun allerdings weitere Einblicke in den Mechanismus dieses Vorgangs geliefert: Durch den lokalen Einfluss von Östrogenen kommt es zur vermehrten Expression von VEGF selbst und auch seines Rezeptors Flk-1/VEGFR2 am Gefäßendothel. Dies setzt daraufhin *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) frei, was zum Einwandern von Neuroblasten aus der SVZ führt. Dies könnte ebenfalls den Einfluss von Östrogen auf die Neurogenese im Hippocampus erklären. Ob VEGF dabei einen direkten Effekt auf neuronale Stammzellen hat, oder indirekt Endothelzellen dazu veranlasst, BDNF zu produzieren, ist allerdings noch nicht abschließend erforscht (Greenberg et al., 2005).

Hierbei weicht die Meinung unterschiedlicher Forschungsgruppen recht weit voneinander ab: kürzliche Untersuchungen weisen darauf hin, dass VEGF teilweise die Apoptose in kultivierten Neurosphären unterdrückt und dass die unterschiedlichen Effekte von VEGF unabhängig voneinander ablaufen. So hatten geringe, ins erwachsene Rattengehirn infundierte



Mengen von VEGF nur einen neurotrophen Effekt in der SVZ, im Bulbus olfactorius und in der SGS. Zu diesen Ergebnissen passt, dass die unterschiedlichen Effekte von VEGF auch über verschiedene Pathways vermittelt werden (Schänzer et al., 2004).

Neben der molekularen Rezeptorstruktur von VEGFR1 und VEGFR2, über welche VEGF seine unterschiedlichen Effekte ausübt, sind mittlerweile auch deren Signaltransduktionswege gut erforscht. So wirkt v.a. VEGF-A am VEGFR1 angiogenetisch über die Bindung von PLC $\gamma$  und die Aktivierung des PKC-Raf-MEK-MAP-Kinase-Pathways und stimuliert darüberhinaus die Entzündungsreaktion bei rheumatoider Arthritis, die Karzinommetastasierung und die Entstehung der Arteriosklerose über noch unbekannte Mechanismen (Shibuya, 2006). Dahingegen wirkt VEGF über die 10 mal stärkere Tyrosinkinaseaktivität von VEGFR2 angiogenetisch, indem VEGFR2 im Gegensatz zu anderen Tyrosinkinasen nicht den Ras Pathway, sondern den Phospholipase C – Proteinkinase C Pathway verwendet, um über die Aktivierung der MAP-Kinase die DNA-Synthese zu stimulieren (Shibuya, 2006).

VEGF, welches in großen Mengen vom *Plexus choroideus* gebildet wird, wirkt einerseits als autokriner Faktor: durch seine permeabilitätsfördernde Wirkung erleichtert er die Sekretion des Liquors in die Ventrikelräume (Breier et al., 1992). Darüberhinaus wirkt die hohe VEGF-Konzentration im CSF neuroprotektiv auf neuronale Stamm- und Vorläuferzellen im angrenzenden Parenchym und damit parakrin (Schänzer et al., 2004).

Im Hippocampus scheint VEGF außerdem als Bindeglied zwischen geistiger bzw. körperlicher Belastung und der Neurogenese zu fungieren. Ratten, die in einer reizreichen Umgebung lebten, produzierten mehr VEGF und damit mehr Neurone. Interessanterweise führt VEGF nicht nur zu einem Anstieg allgemein mitotischer Zellen, sondern auch neuronaler Vorläuferzellen, deren Fraktion innerhalb dieser Zellen ebenfalls zunahm. Frühe neuronale Vorläuferzellen und Neuroblasten hatten *in vitro* einen höheren mitotischen Index als z.B. Gliazellen (Fabel et al., 2003).

## 5. PEDF – Struktur und Funktion

### **a) Vorkommen und allgemeine Strukturmerkmale**

Beim *Pigment Epithelium Derived Factor* (PEDF) handelt es sich um ein 418 Aminosäuren umfassendes und 50 kDa großes Protein, das zum ersten Mal *in vitro* im fetalen humanen Pigmentepithel nachgewiesen wurde (Tombran-Tink and Johnson, 1989). Darüberhinaus konnte die Expression von PEDF mittlerweile in vielen weiteren Bereichen des ZNS (z.B. Hippocampus, Substantia nigra, Rückenmark) und in über 40 anderen Geweben (z.B. Leber, Hoden und Pankreas) nachgewiesen werden (Tombran-Tink et al., 1996). Hier übt es

verschiedene Funktionen aus, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Seiner Struktur zufolge handelt es sich bei PEDF um ein Mitglied der Superfamilie von Serin-Protease-Inhibitoren, den sog. „Serpinen“, die im Organismus an einer Vielzahl von Vorgängen, wie der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, der Komplementaktivierung uvm. beteiligt sind. Damit handelt es sich bei PEDF also um einen engen Verwandten von Ovalbumin bzw. Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI-2). Allerdings weist PEDF keine Proteaseaktivität wie die anderen Mitglieder seiner Familie auf, was darauf schließen lässt, dass seine eigentlichen Effekte ebenfalls nicht über die Inhibierung von Serinproteasen vermittelt werden.

#### **b) PEDF als neuroprotektiver und antiangiogenetischer Faktor**

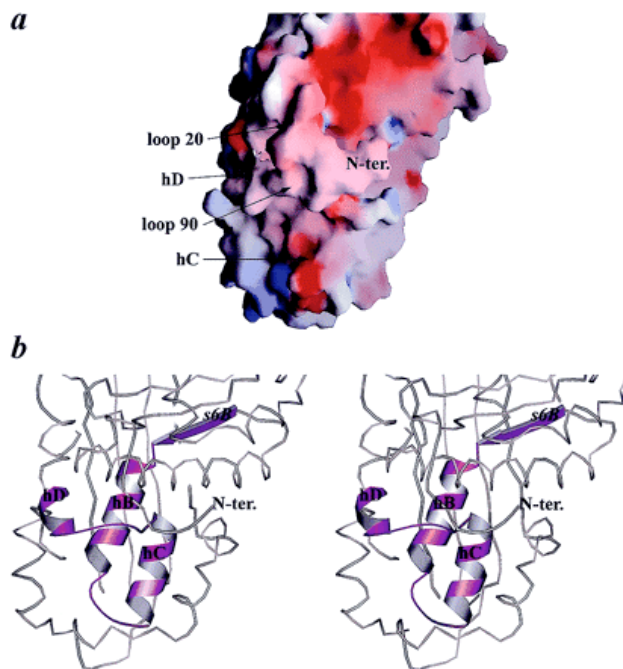
PEDF besitzt wichtige neuroprotektive Funktionen, indem es Photorezeptoren der Retina vor ihrer Zerstörung nach Lichtexposition (Imai et al., 2004) und Ischämie (Takita et al., 2003) bewahrt. Ischämie stellt in diesem Bereich eine der Hauptursachen für Erblindungen durch Retinopathien, Glaukome und die Makuladegeneration (Feigl, 2007) dar. Außerdem konnte festgestellt werden, dass PEDF Motoneurone, deren Axone künstlich durchtrennt worden waren, was normalerweise zu retrograden Degeneration von 50% der Zellen führt, vor dem Untergang schützte (Houenou et al., 1999). Darüber hinaus war PEDF in der Lage, in vielen Bereichen des Gehirns, z.B. im Zerebellum, Zellen wie Granulärzellen vor der Exotoxizität durch Glutamat (Taniwaki et al., 1997) bzw. in Kultur vor oxidativem Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cao et al., 1999) zu schützen.

Eng im Zusammenhang mit den Auswirkungen der Ischämie steht ein weiterer wichtiger Effekt von PEDF, die *Antiangiogenese*. Hypoxie ist ein wichtiger Stimulus für die Neovaskularisierung, welche bei vielen Krankheiten im Bereich des Auges, wie der diabetischen Retinopathie und der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), eine zentrale Rolle spielt (Zhang et al, 2007). Es konnte festgestellt werden, dass Patienten mit diesen Krankheiten signifikant geringere Konzentrationen von PEDF aufwiesen (Spranger et al., 2001). Als Mechanismus für die Antiangiogenese wird dabei, zumindest teilweise, eine Apoptose von Endothelzellen der Gefäße postuliert (Volpert, 2002).

Die Haupteffekte von PEDF, Neuroprotektion und Antiangiogenese, sind, wie oben erwähnt, nicht auf die Fähigkeit, eine Serin-Protease zu inhibieren, zurückzuführen. In einem Experiment, in dem die reaktive zentrale Schleife dieses globulären Proteins, die normalerweise mit der Serin-Protease interagiert, gespalten wurde, persistierten die neuroprotektiven und antiangiogenetischen Effekte (Becerra et al., 1995). Von Interesse war weiterhin, welche Anteile von PEDF für diese Effekte verantwortlich sind und durch welche

Art von Rezeptoren und zellulären Pathways sie vermittelt werden.

Dem neurotrophen Effekt von PEDF konnte eine bestimmte Region im N-Terminus zugewiesen werden, im besonderen den Helices C und D und einer Schleife in der Nähe der Aminosäurenposition 90 (Abb. 2). Dies wurde durch Untersuchungen mit Radioliganden untermauert, die auf eine mögliche Interaktion mit dem bisher noch nicht identifizierten PEDF-Rezeptor auf der Oberfläche von Neuronen in der Granulärschicht des Zerebellums und auf Retinoblastomzellen hinweisen (Alberdi et al., 1999).



**Abb. 2:** Rezeptorbindungsstellen des PEDF Moleküls (Pumiglia et al., 2006)

(a) Ladungsverteilung im Bereich der Bindungsstelle. Loop 20: Bereich mit besonders vielen negativen Ladungen. Helix C/D, Loop 90: verantwortlich für den neurotrophen Effekt von PEDF

(b) Tertiärstruktur der Rezeptorbindungsstellen des PEDF-Moleküls.

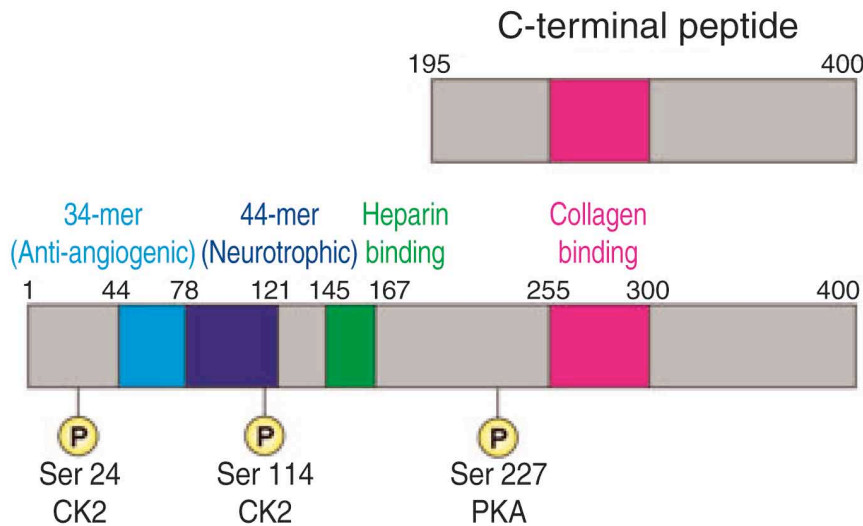
In einem weiteren Experiment wurde ein PEDF Molekül verwendet, dem 62% des C-terminalen Endes inklusive der reaktiven zentralen Schleife fehlten, wobei es immer noch seine neuroprotektiven Effekte auf Rückenmarksneurone von embryonalen Hühnchen aufwies (Houenou et al., 1999). Eine Gruppe von Forschern (Bilak et al., 2002) versuchte daraufhin in einem *in vitro* Versuch genau die Region auszumachen, die für die neuroprotektive Funktion verantwortlich sein könnte und schlussfolgerte, dass die Region von AS 78-121 des humanen PEDF für die Neuroprotektion kultivierter Motoneuronen gegen die Glutamattoxizität verantwortlich sei. Um den spezifischen Rezeptor für diesen Effekt zu identifizieren, inkubierten sie diese Kultur mit fluoreszierendem PEDF (F1-PEDF): dabei konnten sie bestimmte Bindungsstellen auf der Oberfläche der Motoneuronen ausmachen und beobachten, dass PEDF (oder seine Abbauprodukte) nach einer gewissen Zeit auch im Nukleus dieser

Zellen anzutreffen war. Um das genaue Bindungsprofil zu identifizieren, brachten sie einen  $^{125}\text{I}$ -PEDF Radioliganden und eine ansteigende Konzentration von unmarkiertem PEDF in Kontakt mit einer Zellkultur von Motoneuronen. Sie konnten feststellen, dass die Rezeptoren eine Sättigungscharakteristik für PEDF aufwiesen und dass die Bindungsstellen für PEDF (ca. 48000 pro Motoneuron) alle einer einzigen Klasse angehörten. Man kann also den „Überlebensseffekt“ von PEDF auf Motoneurone auf eine spezifische PEDF-Zellrezeptor-Interaktion zurückführen.

Außerdem wurden am PEDF-Molekül Histamin bindende Regionen identifiziert, ebenso kommt es *in vivo* zu einer Glykosylierung des Proteins. Leider konnte bisher noch keine Verbindung dieser Erkenntnisse mit möglichen Rezeptorinteraktionen und Kofaktoren hergestellt werden. Zumindest aber scheinen die glykosylierten Anteile nicht am neuroprotektiven Effekt teilzuhaben, da sie nicht in den Bereich der AS-Positionen 78-121 fallen. Eine Übersicht über die wichtigsten bisher bekannten Bindungsstellen von PEDF und ihre jeweilige Funktion liefert *Abb.3* (Pumiglia et al., 2006).

Wie viele andere Proteine scheint auch PEDF über *Phosphorylierung* reguliert zu werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass bestimmte intrazelluläre Proteinkinasen, wie PKA und CK2, die auch im Serum vorkommen, PEDF an bestimmten Positionen (PKA: S227/ CK2: S24 und S114) phosphorylieren können. Um herauszufinden, inwiefern der Phosphorylierungszustand entscheidend für die Effekte von PEDF ist, wurden phosphorylierte und nicht phosphorylierte Mutanten von PEDF verwendet, mit dem Ergebnis, dass das an den Stellen S24 und S114 phosphorylierte Molekül keinen neurotrophen, aber dafür einen verstärkten antiangiogenetischen Effekt aufwies. (Maik-Rachline et al., 2004).

Abschließend kann man also vermuten, dass die Phosphorylierung eine wichtige Rolle im PEDF-Switch und in der Interaktion mit möglichen Rezeptoren und Kofaktoren übernimmt.



**Abb. 3:** Übersicht über die wichtigsten bisher bekannten Bindungsstellen von PEDF und ihre jeweilige Funktion

### c) PEDF und Tumore

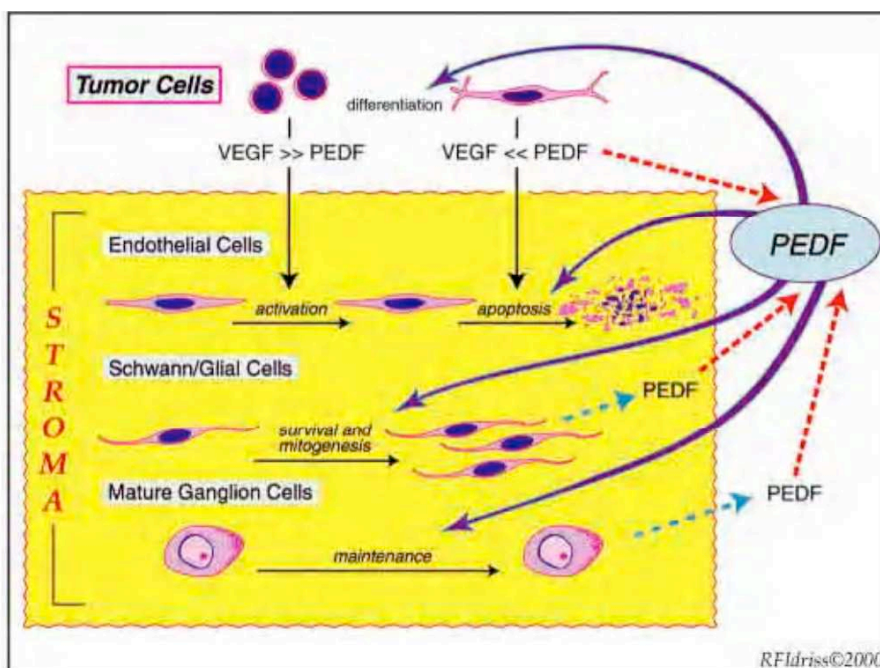
Hochmaligne und schnell wachsende Tumoren überexprimieren Wachstumsfaktoren wie VEGF um die Tumorangiogenese zu fördern. Somit scheint PEDF als Angiogeneschemmer interessant zu sein, der auch apoptotische Eigenschaften auf Endothelzellen besitzt (Stellmach et al., 2001).

Die Aktivität gegen die Tumorangiogenese ist aber nicht allein auf diesen Mechanismus zurückzuführen: PEDF wird von Schwann-Zellen und reifen Ganglienzellen in hohen Konzentrationen sezerniert, was bei den Schwann-Zellen zu einer Proliferation und bei den Ganglienzellen zu einem Apoptoseschutz führt. Über einen positiven Feedbackmechanismus kommt es darüber hinaus zu einer weiteren Sekretion von PEDF durch diese Zellen (siehe auch *Abb. 4*/ Crawford et al., 2001).

Außerdem fungiert PEDF als ein potenter Aktivator für Differenzierungsvorgänge: eine ausdifferenzierte Zelle verliert bekanntlich ihre Fähigkeit zu proliferieren und sich zu teilen, da sie innerhalb des Zellzyklus nicht mehr in die S-Phase eintreten kann, sondern in die sog. G0-Phase, einer Art „Abstellgleis“, überführt wird. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass für eine Zelle, die sich differenzieren soll, Umstände geschaffen werden müssen, die eine weitere Proliferation ausschließen. Genau das scheint der primäre Mechanismus von PEDF in diesem Zusammenhang zu sein, der in vielen unterschiedlichen Zelltypen nachgewiesen werden konnte (Hjelmeland et al., 1999). Allerdings ist natürlich nicht ausgeschlossen, dass PEDF neben diesem indirekten Weg auch auf direkte Art und Weise die Differenzierung einer Zelle induzieren kann. Am Beispiel der intratumoralen Injektion von PEDF in Neuroblastome konnte gezeigt werden, dass PEDF die Differenzierung von unreifen Tumorzellen in Neurofilamente in nur 4 Tagen induzierte. Das Ergebnis war ein signifikant reduziertes Tumorwachstum in Ganglioneuroblastomen und Ganglioneurinomen, in denen sich eine

große Anzahl von Schwann-Zellen und Ganglienzellen befand (Crawford et al., 2001).

Eine Studie aus dem Jahre 2005 (Filleur et al., 2005) untersuchte den Effekt von PEDF auf das Wachstum von Adenokarzinomzellen in der Prostata und stellte auch hier einen Zusammenhang zwischen den antiangiogenetischen und den trophischen Eigenschaften von PEDF fest. Desweiteren wurde versucht, die dafür spezifisch verantwortlichen Strukturen von PEDF zu identifizieren. Varianten mit unterschiedlich langen Bestandteilen von PEDF wurden getestet, darunter ein N-terminales 44-meres und ein weiteres C-terminales 33-meres Peptid und ein dazwischenliegendes Peptid mit dem Namen ERT. Alle drei Varianten verursachten eine Verringerung des Tumorwachstums von Y-79 und PC-3 Karzinomzellen, allerdings scheinen unterschiedliche Effekte der einzelnen Peptide zugrunde zu liegen. Es konnte nachgewiesen werden, dass das 44-mer einen antiangiogenetischen Effekt hatte, welchen sie auf eine Interaktion mit dem angenommenen Rezeptor PEDF-R<sup>A</sup> zurückführten, wohingegen das 34-mer einen Effekt auf die Differenzierung neuroendokriner Zellen hatte. Die Autoren schrieben diesen Effekt einer Interaktion mit dem putativen Rezeptor PEDF-R<sup>N</sup> zu und konnten ihn durch Verwendung neuronenspezifischer Marker wie der neuronenspezifischen Enolase (NSE) oder des Chromogranin A beweisen. Interessanterweise hatte ERT sowohl antiangiogenetische als auch neurotrophe Effekte.



**Abb. 4:** vielfältige autokrine und parakrine antitumorgene Einflüsse von PEDF in Neuroblastomen

## 6. Das Gleichgewicht von VEGF und PEDF

Aus den bisherigen Betrachtungen wird bereits deutlich, dass VEGF und PEDF viele zumeist gegensätzliche Eigenschaften in unterschiedlichen Bereichen des Körpers aufweisen (*Abb. 5*). Physiologischerweise scheint ein Gleichgewicht zwischen VEGF und PEDF vorzuliegen und das Übergewicht eines Faktors kann bei physiologischen Vorgängen wie der Regeneration oder pathophysiologisch z.B. bei der Tumorangiogeneseinduktion vorkommen (Ohno-Matsui et al., 2001).

Bei differenzierten Pigmentepithelzellen der Retina wurde deren Menge an RNA für VEGF und PEDF mit der von undifferenzierten verglichen und ein höheres Maß an beiden Faktoren in den differenzierten Zellen festgestellt. Weiterhin wurden die Zellen einer steigenden Konzentration von  $H_2O_2$ , sog. oxidativem Stress, ausgesetzt und ein deutlicher Abfall von PEDF, aber nicht von VEGF festgestellt. Folglich reagierte das Gewebe mit einem Anstieg migrierender mikrovaskulärer Endothelzellen, die auf den dominierenden parakrinen Effekt von VEGF zurückzuführen war (Ohno-Matsui et al., 2001). Für die Aufrechterhaltung v.a. des retinalen Pigmentepithels scheint dieses Gleichgewicht von entscheidender Bedeutung zu sein, da ein Ungleichgewicht zu schwerwiegenden Erkrankungen wie der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) führt, welche die häufigste Ursache für Erblindung jenseits des 60. Lebensjahres darstellt.

<b><u>VEGF wirkt:</u></b>	<b><u>PEDF wirkt:</u></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Angiogen</li><li>➤ Tumorprogressionsfördernd</li><li>➤ Inflammatorisch</li><li>➤ Neuroprotektiv</li><li>➤ Neurogen</li><li>➤ Permeabilitätssteigernd</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Antiangiogen</li><li>➤ Tumorprogressionshemmend</li><li>➤ Antiinflammatorisch</li><li>➤ Neuroprotektiv</li></ul>

**Abb. 5:** Gegenüberstellung von zentralen Effekten von VEGF und PEDF

## B. Zielsetzung und Fragestellung

### 1. Allgemeine Fragestellung

Ein möglicher Effekt von PEDF, der bisher kaum erforscht ist, ist die Auswirkung von PEDF auf die Neurogenese. Deshalb stellt sich hier die Frage: *welche Auswirkungen hat PEDF ganz generell auf neuronale Stammzellen in den Hauptbereichen der adulten Neurogenese, der Subventrikulärzone und dem Hippocampus?*

### 2. Spezielle Fragestellungen

In Anbetracht der bisher entdeckten Effekte in verschiedenen Organen und Zellen von PEDF *in vivo* und der Wechselwirkungen zwischen VEGF und PEDF werden folgende Fragen formuliert:

1. fungiert PEDF auch im Bereich der adulten Neurogenese *in vivo* als Antagonist des Faktors VEGF?
2. inwiefern macht sich der trophische, d.h. die Differenzierung beeinflussende Effekt von PEDF auch auf neuronale Stammzellen bemerkbar?
3. Wie unterscheiden sich die Effekte des Faktors PEDF in der Subventrikulärzone und im Hippocampus?

Von besonderem Interesse sind in dieser Arbeit zudem zwei Aspekte:

- Die absolute Zahl neu entstandener Zellen in SVZ und Hippocampus anhand der BrdU Färbung.
- Der Differenzierungsgrad der neu entstandenen Zellen anhand immunhistologischer Marker (wie z.B. Doublecortin (DCX)).

In einem letzten Schritt soll anhand von Doppelfärbungen mit BrdU/GFAP (Marker für Gliazellen) und BrdU/TUJ-1 (Marker für Neuronen in einer frühen Differenzierungsphase) eine Aussage darüber getroffen werden, *ob, in welchem Maß und in welche Richtung* VEGF und PEDF die Differenzierung von Zellen im ZNS beeinflussen.

Allgemein sollen dabei folgende Arbeitshypothesen überprüft werden:

- Nullhypothese  $H_0$ : unterschiedliche Wachstumsfaktoren führen **nicht** zur Verkleinerung bzw. Vergrößerung der Zelldichte bzw. haben **keinen** Effekt auf den Differenzierungsgrad der Zellen.



- Hypothese H<sub>1</sub>: unterschiedliche Wachstumsfaktoren führen zur Verkleinerung bzw. Vergrößerung der Zelldichte bzw. haben einen Effekt auf den Differenzierungsgrad der Zellen.

### 3. Strategie zum Nachweis neu entstandener Neurone

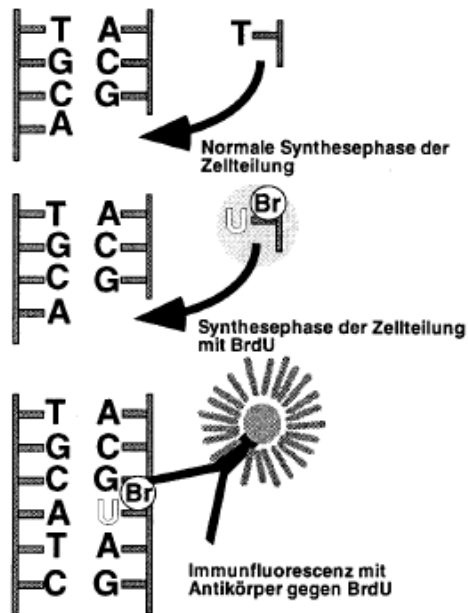
#### I. Nachweis der Zellproliferation - BrdU

Um feststellen zu können, welche Zellen sich nach Beginn des Experiments neu geteilt haben, müssen die Nachkommen neuronaler Stamm- bzw. Vorläuferzellen zuverlässig markiert werden können. Als elegante Methode stellt sich hierbei die Applikation eines Thymidinanalogs mit dem Namen *5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU)* heraus, das sich nach systemischer Applikation gleichmäßig in allen Körperkompartimenten verteilt und sich während der S-Phase der Mitose zuverlässig in die DNA neu entstandener Zellen anstatt des Thymins einbaut (siehe auch *Abb.6*). Überschüssiges BrdU wird rasch aus dem Körper eliminiert und hat deshalb nur eine relativ kurze Verweildauer von ca. 2 Stunden, weshalb man davon ausgehen kann, dass sich Zellen, die BrdU eingebaut haben, auch in dieser Zeitspanne geteilt haben müssen (Takahashi et al., 1992; Dolbeare, 1995a, 1996). Der Einbau von BrdU lässt sich durch immunhistochemische Technik sichtbar machen. Teilt sich eine auf diese Art und Weise markierte Zelle allerdings weiter, so kommt es zu einem exponentiellen Verdünnungseffekt, so dass das BrdU-Signal nach 3 Mitosen unter die histologische Nachweisgrenze fällt (Ward et al., 1991).

Kontrovers wird diskutiert, ob BrdU tatsächlich ein zuverlässiger Marker für Zellteilungen ist, da BrdU auch bei DNA-Reparaturvorgängen eingebaut wird (Rakic, 2002).

Cooper-Kuhn et al. (2002) und Parent et al. (1999) konnten dies allerdings in ihren Experimenten mit geschädigten und apoptotischen Zellen nicht bestätigen.

Somit sehen die meisten Wissenschaftler, die sich mit dieser Thematik befassen, BrdU als zuverlässigen Marker für den Nachweis neu entstandener Zellen an.



**Abb. 6**  
Kempermann et al., 1998

Markierung von mitotischen Zellen mit Bromodeoxyuridin. Die schematische Zeichnung zeigt im oberen Teil, wie in der normalen Synthesephase (S-Phase) der mitotischen Zellteilung Thymidin (T) sich mit Adenin (A) paarend in den neuen Strang der DNA eingebaut wird. Wird das Thymidinanalogon Bromodeoxyuridin (BrdU) systemisch im Überfluss angeboten, kompetitiert es mit Thymidin um den Einbau in die DNA und wird statt Thymidin in den neu synthetisierten Strang inkorporiert (mittleres Bild). Zellen, die BrdU enthalten, können mit immunhistochemischen Antikörpern sichtbar gemacht werden (unteres Bild).

## II. Nachweis einzelner Differenzierungsschritte

### **a) DCX**

Doublecortin (DCX) ist ein Protein, das bereits in sehr frühen Stadien der Gehirnentwicklung (Untersuchung an Mäusen) nachweisbar ist, sich an Mikrotubuli unreifer Neurone bindet und diese dabei gleichzeitig bündelt und stabilisiert. (Brown et al., 2003). DCX dient somit als spezifischer Marker für unreife, frühe neuronale Entwicklungsstufen und eignet sich deshalb ideal zu unserem relativ kurzzeitigen Versuchsaufbau. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass DCX ein spezifischer Marker für migrierende Neuroblasten ist, die oftmals eine gemeinsame Anfärbbarkeit mit dem dafür etablierten Marker PSA-NCAM aufweisen. So scheint ein intaktes DCX-Gen v.a. für die kortikale Entwicklung wichtig zu sein, da eine mutierte Variante eine kortikale Dysplasie zur Folge zu haben scheint (des Portes et al., 1998; Gleeson et al., 1998)

### **b) TUJ-1**

TUJ-1 ist ein neuronales Klasse III  $\beta$ -Tubulin. Es kommt nicht in Gliazellen vor und wird nur zu einem sehr frühen Zeitpunkt der neuronalen Entwicklung exprimiert (Lee et al., 1990). Deshalb eignet es sich hervorragend für unser Versuchssetting, da es hochspezifisch frühe Entwicklungsstadien der neuronalen Zelllinie aufzeigt.

### **c) GFAP**

Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) findet sich spezifisch in Astrozyten und zeigt damit die Differenzierung in Richtung Gliazellen an (Johannson, 2003). Wie oben bereits erwähnt, können nach Arbeiten von Alvarez-Buylla hiermit auch die B-Zellen angefärbt werden, aus denen sich als neuronale Vorläuferzellen zunächst die C- und schließlich die A-Zellen entwickeln, und damit Vorstufen von Gliazellen und Neuronen darstellen (Alvarez-Buylla et al., 2002).

Abschließend ist darauf hinzuweisen, dass bei der gewählten Methode natürlich nur kurzfristige Effekte der Wachstumsfaktoren und deren Interaktion sichtbar gemacht werden können, da der Versuchsaufbau keine Langzeitbeobachtungen zulässt (s.u.)

## C. Material und Methoden

### 1. Versuchstiere

Für die vorliegenden Experimente, genehmigt nach vorliegendem Ethikvotum der Tierkommission der Universität Regensburg, wurden männliche Fischerratten des Stammes F-344/DuCrI verwendet, die nach Gewicht zwischen 220 und 250g pro Ratte bei der Firma Charles River, Sulzfeld, Deutschland, bestellt worden sind. Laut Gewichtstabelle in der Preisliste der Firma aus dem Jahr 2005 waren die Tiere im Schnitt 84 Tage alt. Insgesamt handelte es sich also um 36 Versuchstiere, die in die in *Tabelle 1* aufgelisteten Gruppen eingeteilt wurden. Die Tiere waren vor Beginn des Experiments und auch währenddessen in Standardkunststoffkäfigen (Typ 3H, Firma Ehret, Emmendingen, Deutschland) mit Metallgitterdeckeln untergebracht. Die Käfige wurden einmal pro Woche gereinigt, ansonsten wurden die Tiere nur durch die tägliche Applikation von BrdU in ihrem normalen Tagesablauf gestört. Die Tiere hatten in dieser Zeit uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung. Als Nahrung diente hierbei das Produkt Ssniff Rattenhaltung (V1534000). Weiterhin wurde ein strenger Tag-Nacht-Rhythmus von täglich 12 h eingehalten (künstliches Licht in der Zeit von 7.00 Uhr und 19.00 Uhr, zusätzlich Tageslicht während der Injektionen) bei Klimabedingungen von 21° C und einer durchschnittliche Luftfeuchtigkeit von 55%.

Eine Unterscheidung der Tiere war zusätzlich zur Beschriftung der Käfige auch durch Stanzungen in den Ohrläppchen der Tiere möglich.

Während der Dauer des Experiments starben insgesamt 3 Tiere (G43 R8, G46 R14 und G48 R3) aus unerklärlichen Gründen.

Vor der Applikation des BrdU wurden die Tiere jeden Tag gewogen.

### 2. Implantation der Pumpen

Zur kontinuierlichen Applikation der in *Tabelle 1* aufgelisteten Lösungen mussten den Versuchstieren osmotische Minipumpen vom Typ Alzet® (DURECT Corporation, Cupertino, Kalifornien/ USA) implantiert werden. Vor der Implantation wurden die Pumpen ordnungsgemäß nach der Anleitung der Herstellerfirma vorbereitet. Hierzu wurden die Pumpen mit jeweils 300µl der entsprechenden Infusionslösung, d.h. aCSF, VEGF, VEGF+ PEDF in unterschiedlichen Konzentrationen und PEDF befüllt. Dies geschah mit Hilfe von 1ml Spritzen und Kanülen der Größe 27G mindestens 4- 6 Stunden vor der Implantation der Pumpen. Da die Pumpen erst bei einer Temperatur von 37° C zu arbeiten beginnen wurden sie

nach dieser Vorbereitung noch über Nacht in einem Brutschrank mit dieser Temperatur belassen.

Die Implantation der Pumpen geschah jeweils am Tag 0 der jeweiligen Versuchsreihe mit folgendem Ablauf:

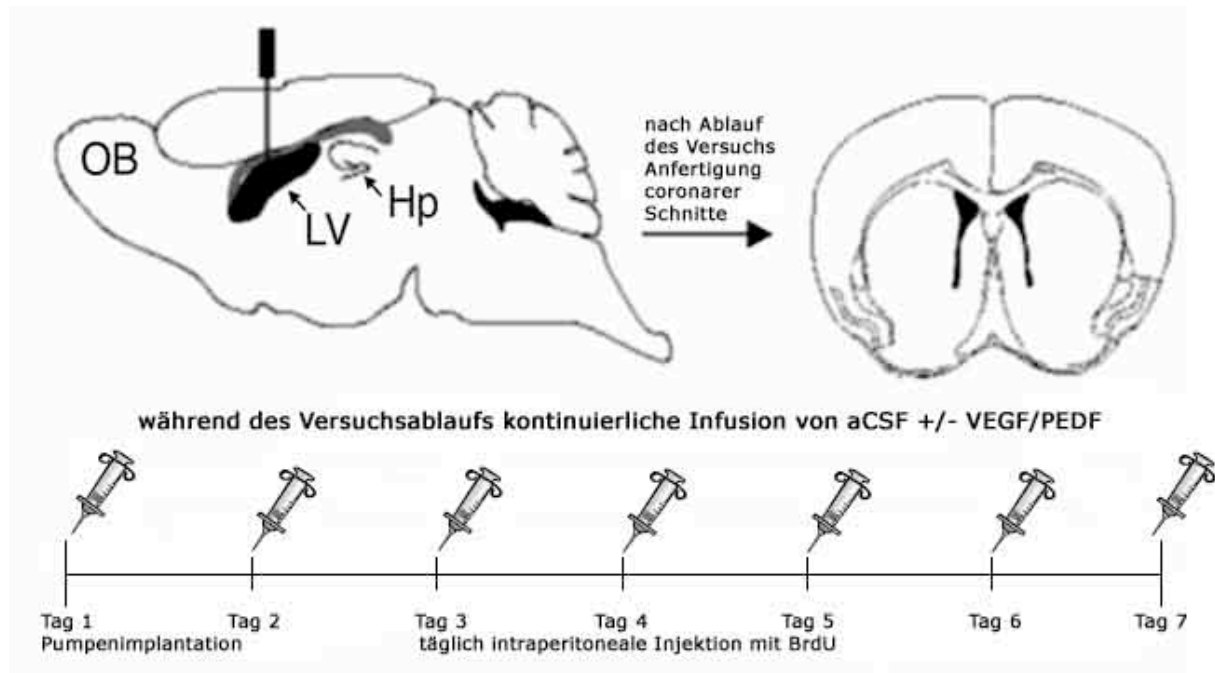
zunächst wurden die Versuchstiere mit einem Narkosegemisch bestehend aus NaCl (0,9%) , Ketamin (100 mg/ml), Xylazin (2%) und Vetranquil 1% (Wirkstoff: Acepromazin (13,56 mg/ml)) anästhesiert um dann in einer stereotaktischen Fixationsmaschine in Position gebracht zu werden. Nach Rasur des Fells im Operationsgebiet wurde nun mit Hilfe eines Sagittalschnitts die Haut und das darunterliegende Bindegewebe inzidiert und danach bis zum Periost des Schädeldachs, mit einwandfreier Sicht auf das Bregma, weiterpräpariert. Außerdem wurde eine subkutane Hauttasche im Bereich der oberen Wirbelsäule zum Verbleib der Pumpe geschaffen. Mit Hilfe der stereotaktischen Einrichtung wurde dann die exakte Position des Bregmas eingestellt und abgelesen. Um später die Pumpenkanüle genau im rechten Seitenventrikel zu platzieren musste von dem abgelesenen Wert ein Betrag von 0,8 cm (anterior-posterior) und 1,4 cm (medial-lateral) abgezogen werden. An dieser Stelle wurde nun mit einem Diamantbohrer (Firma Meisinger, Deutschland) ein Loch gesetzt und die Kanüle im Folgenden platziert (Eindringtiefe 5mm) und mit schnell härtendem, aus zwei Komponenten bestehenden Zahnzement (Harvard Cement, Firma Richter & Hoffmann, Berlin, Deutschland) fixiert. Nach der Härtungsphase wurde die Wunde ordnungsgemäß versorgt und genäht und das Tier danach zum Aufwachen wieder in seinen Käfig verbracht.

### 3. Applikation von BrdU

Um neu proliferierte Zellen nachweisen zu können wurde der Zellproliferationsmarker BrdU (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Um einen ausreichenden Spiegel von BrdU zu erreichen, wurde es in Form einer verdünnten Lösung (NaCl, 0,9%) den Tieren am Tag der Implantation der Pumpen mit einer Konzentration von 10mg/ml (50mg/kg KG) und an den restlichen Tagen des Experiments mit einer Konzentration von 20mg/ml (100mg/kg KG) intraperitoneal appliziert. Hierbei wurden Tuberkulinspritzen (27G) verwendet und darauf geachtet, dass die Tiere jeden Tag um die gleiche Zeit (ca. 16.00 Uhr) ihre Injektionen erhielten. Je nach Körpergewicht erhielten die Tiere ein Volumen von 1 – 1,25ml.

## 4. Versuchsaufbau

Eine zusammenfassende Übersicht über den Versuchsaufbau liefert *Abb. 7*:



**Abb. 7:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Hp= Hippocampus; LV= lateraler Ventrikel; OB= Bulbus olfactorius.

Das Experiment erstreckte sich insgesamt über eine Dauer von 7 Tagen. Zunächst wurde den Tieren eine Mikropumpe implantiert (Tag 1), die - abhängig von der jeweiligen Gruppe – eine bestimmte Lösung auf kontinuierliche Weise in die Seitenventrikel der Gehirne einbringen sollte. An den darauf folgenden Tagen 1-7 wurde den Tieren regelmäßig BrdU intraperitoneal appliziert. Am ersten Tag nach Versuchsablauf wurden die Tiere geopfert, perfundiert und ihre Gehirne daraufhin mittels eines Schlittenmikrotoms geschnitten.

Die Schnitte wurden danach gefärbt und dann unter dem Mikroskop ausgewertet.

Um die unterschiedlichen Auswirkungen der zu untersuchenden Wachstumsfaktoren PEDF und VEGF und deren Interaktionen möglichst exakt festhalten und vergleichen zu können, wurden die Tiere in sechs Gruppen á sechs Tieren nach folgendem Schema eingeteilt:

Lösung	Gruppen	Anzahl Tiere pro Gruppe
aCSF	G43 R1-R3 G46 R1-R3	6
VEGF 10µg/ml	G43 R4-R6 G46 R4-R6	6
PEDF 10µg/ml	G48 R5-R10	6
PEDF 20µg/ml	G46 R14-R19 (R14 verstorben) G48 R1-R2 (R2 verstorben)	6
VEGF 10µg/ml + PEDF 10µg/ml	G43 R7-R9 (R8 verstorben) G46 R7-R10	6
VEGF 10µg/ml + PEDF 20µg/ml	G43 R10-R12 G46 R11-R13 (G48 R3-R4)	6

**Tab.1:** Übersicht über einzelne Gruppen und deren jeweilige Behandlung während des Versuchsablaufs

## 5. Aufbereitung der Gehirne

### a) Perfusion

Nach letztmaliger Injektion des BrdU am Morgen des achten Tags des Experiments wurde zwei Stunden später mit der Perfusion der Ratten begonnen.

Die Tiere wurde hierzu zunächst gewogen und dann durch eine gewichtsabhängige intraperitoneale Gabe von Narcoren® (wirksamer Arzneibestandteil 160mg Pentobarbital-Natrium) narkotisiert. Nachdem die Tiere auf Schmerzreize keine Reaktion mehr zeigten, wurde der Thorax operativ eröffnet und eine abgerundete Perfusionsnadel in den linken Ventrikel eingebracht. Daraufhin wurde über ein Pumpensystem 7 Minuten lang NaCl (0,9%ig) in die Zirkulation des Tieres eingespült um daraufhin die Tiere mittels einer 8-minütigen Perfusion mit Paraformaldehyd (4%ig) zu fixieren. Anschließend wurden die Gehirne freipräpariert, über Nacht in 4%ige Paraformaldehydlösung gegeben und am nächsten Tag das Gewebe in 30%ige Saccharoselösung (in 0,1M PO<sub>4</sub>-Puffer) überführt. Im Weiteren wurde es bei 4°C im Kühlschrank gelagert, bis die Gehirne zu Boden der Gefäße abgesunken waren.

### b) Schneiden der Gehirne

Zur weiteren Aufbereitung der Gehirne wurden die Gehirne auf einem Schlittenmikrotom

(SM200R, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) geschnitten: zunächst wurde mithilfe einer Rasierklinge der Bulbus olfactorius und das Zerebellum vom restlichen Gehirn getrennt und mit derselben Klinge eine Markierung auf der kontralateralen Hälfte der Bohrung zur besseren Orientierung gesetzt. Eine spezieller Kupferaufsatz wurde dann mit Trockeneis heruntergekühlt und mit einer Schicht Tissue-Tek® (Firma Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) versehen, das eine feste Verbindung zwischen Platte und Gehirn herstellen soll. Nach horizontaler und vertikaler Ausrichtung der Platte mittels einer Wasserwaage wurde das Gehirn mit einer dünnen Schicht PO<sub>4</sub>-Puffer (0,1M) aufgefroren und noch zusätzlich einige Minuten mit Trockeneis bedeckt, bis es selbst durchgefroren war. Im Weiteren konnten dann 30µm dünne koronare Schnitte angefertigt werden, die in 96 well Platten (1 well pro Schnitt) überführt wurden. Die wells beinhalteten jeweils 200µl Kryoprotektionslösung (25% Glycerin, 25% Ethylenglykol, 50% 0,1M PO<sub>4</sub>-Puffer), um das Gewebe vor der anschließenden Lagerung bei 4°C zu schützen.

## 6. Immunhistochemie

### a) BrdU

Um die mit BrdU markierten neu proliferierten Zellen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, war eine immunhistochemische Färbung notwendig, die an den Schnitten in freischwimmendem Zustand durchgeführt wurde: hierzu wurde zunächst die in der Kryoprotektionslösung aufbewahrten Schnitte (jeweils eine Spalte, sprich jeder 12. Schnitt aus einer 96-well Platte) in eine 6-well Platte (ein well pro Tier) überführt. Zur besseren Handhabung wurden kleine Einlagevorrichtungen mit feinen Netzen am Boden, sog. *Netwells*, in die Wells eingelegt. Die Platten enthielten zunächst Tris Buffered Saline (TBS, 92% H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 5% 1M Tris-Cl pH 7,4, 3% 5M NaCl), in denen das Gewebe gewaschen wurde. Daraufhin wurde es mit 0,6%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS bei Raumtemperatur (RT) behandelt, um die endogene Peroxidase des Gewebes zu eliminieren. Nach zwei weiteren Waschschritten in TBS wurde das Gewebe für 1-2 Stunden bei 65 °C mit 50%igem Formamid und 2x SCC (0,3 M NaCl, 0,03 M NaCitrat, H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) inkubiert und danach nochmals für 5 Minuten bei RT in 2x SCC gewaschen. Hierauf wurden die Schnitte für 30 Minuten mit 2N HCl bei 37 °C inkubiert, was zusammen mit den vorangegangenen Schritten zu einer Auflösung der Zellmembran und einer Denaturierung der DNA führte, beides Voraussetzungen für die Antikörper, um an das in die Erbsubstanz eingebaute BrdU zu binden. Um wiederum einen neutralen pH zu erreichen, wurde danach das Gewebe für 10 Minuten bei RT mit einem 0,1 %igen Borat-Puffer (für 500ml gilt: 3,09 g Borsäure, ca. 450 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, mit 5N NaOH auf



pH 8,5 einstellen und auf 500ml auffüllen) behandelt. Nach vier weiteren Waschgängen in TBS bei RT wurden die Schnitte für eine Stunde mit einem fish-skin-Gelatine-Puffer (500ml: 497,5ml TBS, 5g Bovine Serum Albumin, 2ml fish-skin-Gelatin 50%, 0,5ml Triton-X 100) bei RT inkubiert, um durch Absättigung elektrostatischer Ladungen spätere unspezifische Bindungen der Antikörper mit anderen Proteinen zu verhindern. Als vorerst letzter Schritt wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (mouse monoclonal antibody to BrdU, Firma Roche, Mannheim, Deutschland; Ausgangskonzentration 100µg/ml, Endkonzentration 0,4µg/ml, Verdünnung in fish-skin-Gelatine-Puffer) inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Gewebe zunächst wieder zweimal bei RT in TBS und daraufhin einmal in fish-skin-Gelatine-Puffer gewaschen um daraufhin für zwei Stunden mit dem Sekundärantikörper (donkey anti mouse, biotiniliert, Firma Jackson ImmunoResearch, Westgrove, USA; Ausgangskonzentration 0,75mg/ml, Endkonzentration 2,5µg/ml Verdünnung in fish-skin-Gelatine-Puffer) inkubiert zu werden. Die Inkubation mit den Antikörpern erfolgte jeweils in 48well-Platten. Daraufhin wurde das Gewebe, nach zweimaligem Waschen in TBS und einmaligem Waschen in fish-skin-Gelatine-Puffer, für zwei Stunden bei RT mit dem ABC-Kit Vectastain® (zwei-Komponentensystem, wirksamer Bestandteil horse reddish peroxidase, Firma Vector, Burlingame, California, USA) inkubiert. Dieser Schritt dient zur weiteren Aufzweigung des Bindungsbaums, um im Endeffekt eine deutlichere Farbreaktion zu erzielen. Nach dreimaligem Waschen in TBS wurden die Schnitte dann mit einem DAB-Kit (Peroxidase Substrat Kit, Firma Vector, Burlingame, California, USA) für 8-10 Minuten entwickelt um die Antigen-Antikörper-Bindereaktion färberisch darzustellen.

Anschließend wurden die Schnitte stereotaktisch auf Objektträger (Super Frost, Firma Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen um sie dann über Nacht trocknen zu lassen. Als letzter Schritt wurden die Schnitte dann mit NeoMount® (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) und Deckgläsern eingedeckt.

## **b) DCX**

Da bei der immunhistochemischen Färbung mit DCX im Prinzip das gleiche free-floating Schema wie bei der BrdU-Färbung angewendet wurde, soll hier nur auf die Unterschiede eingegangen werden:

Da der Antikörper nicht gegen Strukturen im Zellkern gerichtet ist, musste dessen Membran auch während der Färbung nicht aufgelöst werden. Somit entfielen die Schritte der Behandlung mit HCl und der anschließenden Neutralisierung des sauren Milieus mit Borat-Puffer. Der erste Tag beinhaltete neben dem zweimaligem Waschen in TBS (0,1M, pH 7,4)

und der Blockierung unspezifischer Bindungen (3% donkey-Serum / 0,1% Triton 100/ TBS) also nur die Inkubation mit dem Primärantikörper (goat polyclonal antibody Doublecortin (C-18): sc-8066, Firma Santa Cruz Biothechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien; Ausgangskonzentration 0,2mg/ml, Endkonzentration 0,4µg/ml) 4°C über Nacht.

Am zweiten Tag wurde das Gewebe nach anfänglichen mehrmaligen Waschschritten in TBS dann mit dem Sekundärantikörper (donkey anti goat, biotililiert, Firma Jackson ImmunoResearch, Westgrove, USA; Ausgangskonzentration 0,8mg/ml, Endkonzentration 2,6µg/ml Verdünnung in Blocklösung) für 2h inkubiert und anschließen nochmals dreimal in TBS gewaschen. Danach wurde mit 0,3%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Lösung die endogene Peroxidase blockiert und anschließen nach zweimal mit TBS gewaschen. Die anschließenden Entwicklungsschritte entsprachen dem Protokoll der BrdU-Färbung.

## 7. Immunfluoreszenz

### **a) Doppelfärbung: BrdU/ TUJ-1**

Diese Färbung weist große Ähnlichkeiten mit der immunhistochemischen Färbung für BrdU auf. Deshalb sollen im Folgenden nur die Unterschiede in beiden Verfahren erläutert werden: Zunächst erstreckte sich die Färbung auf Grund der weiteren Antikörper über drei Tage und es wurden nicht alle Schnitte einer Spalte einer 96-well Platte verwendet, sondern nur insgesamt 6, jeweils drei aus den Bereichen der SVZ und des Hippocampus. Unterschiede in der Methode sahen wie folgt aus: eine Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> war nicht notwendig, da es sich um einen fluoreszierenden Antikörper handelte und damit keine Blockierung der endogenen Peroxidase notwendig war.

Als Primärantikörper für das BrdU wurde ein rat-anti-BrdU-Antikörper verwendet (Firma Biozol, Eching, Deutschland, Ausgangskonzentration: 0,5mg/ml, Endkonzentration 2,5µg/ml).

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dann mit einem sekundären Antikörper (donkey-anti-rat, Firma Jackson ImmunoResearch, Westgrove, USA, Ausgangskonzentration: 1,3mg/ml, Endkonzentration 6,5µg/ml, Verdünnung in fish-skin-Gelatine-Puffer) für 2 Stunden inkubiert. Alle Waschschriffe entsprachen bis dahin denen der immunhistochemischen Einfachfärbung mit BrdU. Die nun folgenden Schritte mussten auf Grund der Fluoreszenz im Dunkeln erfolgen: zunächst wurde anstatt eines ABC-Kits für zwei Stunden mit Straptavidin-Texasrot (Fa. Molecular Probes, USA; Endkonzentration 1µg/ml) inkubiert. Streptavidin arbeitet im Prinzip genauso wie Avidin, nur dass es sich hierbei um ein reineres Produkt mit weniger unspezifischen Bindungen handelt, welches gentechnisch aus dem Bakterium

*Streptomyces avidinii* gewonnen wird.

Daraufhin wurde das Gewebe dreimal mit TBS gewaschen und danach über Nacht mit dem Primärantikörper gegen TUJ-1 (mouse-anti-Mono  $\beta$  Tubulin, Firma Covance, Berkeley, Kalifornien; Ausgangskonzentration 1mg/ml, Endkonzentration 10 $\mu$ g/ml, Verdünnung in fish-skin-Gelatine-Puffer) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen in TBS für 1-2 Stunden mit dem sekundären Antikörper (donkey-anti-mouse Alexa Fluor® 488, Firma Molecular Probes, Eugene, USA; Ausgangskonzentration 1mg/ml, Endkonzentration 1 $\mu$ g/ml, Verdünnung in fish-skin-Gelatine-Puffer) inkubiert und danach nochmals dreimal in TBS gewaschen. Hierauf mussten die Schnitte schnellstmöglich bei gedimmtem Licht auf Objektträger aufgezogen und anschließend nach kurzer Trocknungsphase mit Prolong® Antifade-Kit (Fa. Molecular Probes, Eugene, USA) eingedeckt werden.

#### **b) Doppelfärbung BrdU/GFAP**

Exakt das gleiche Schema wie bei der vorherigen Doppelfärbung kam auch hier zur Anwendung, mit der einzigen Ausnahme, dass hier ein Primärantikörper gegen GFAP (rabbit-anti Glial Fibrillary Acidic Protein (cow), Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark; Ausgangskonzentration 4,1mg/ml, Endkonzentration 8,2 $\mu$ g/ml) zur Anwendung kam. Als Sekundärantikörper wurde ein donkey-anti-rabbit FITC Antikörper (Fa. Jackson ImmunoResearch, Westgrove, USA; Ausgangskonzentration 1,5mg/ml, Endkonzentration 7,5 $\mu$ g/ml) verwendet.

## **8. Stereologiesystem**

Zur Beurteilung der absoluten Zellzahl im Hippocampus und der SVZ bei den immunhistochemischen Färbungen mit BrdU und DCX kam folgendes Verfahren zur Anwendung:

Die oben genannten Regionen wurden mit Hilfe eines inversen Lichtmikroskops (Modell IX70, Fa. Olympus) mit der Objektivvergrößerung 20x (ohne Immersionsöl) und mit einem allgemein anerkannten (Glaser et al., 2000) Stereologiesystem (Motorized Microscope Stages: OptiScan™, F. PRIOR Scientific) zunächst vermessen. Hierbei wurde die Software Stereoinvestigator 2000 (Fa. MicroBrightField Ltd.) verwendet, die die Fläche des jeweiligen Hippocampus bzw. SVZ in  $\mu\text{m}^2$  angab. Im Gegensatz zur oft üblichen Methode im Umgang mit diesem System entschieden wir uns für folgende Modifikationen:

- Trotz des erheblich größeren Aufwands verzichteten wir auf die Anwendung von Zellrastern und zählten in der abgemessenen Region die tatsächliche Anzahl von Zellen aus, wofür wir die Filter BF und Ph1/PhC verwendeten. Dafür entschieden wir uns, da die Approximation der Zellzahl durch ein Zählfeld und der Hochrechnung auf die Fläche der jeweiligen Region keine zuverlässige Aussage über die tatsächliche Zellzahl lieferte.
- Wir rechneten die Ergebnisse aus den Einzelschnitten nicht auf das mutmaßliche Volumen der entsprechenden Regionen hoch, sondern verglichen die Zelldichte der einzelnen Tiere bzw. Gruppen miteinander. Wir erachteten dies auf Grund der großen Abstände zwischen den Einzelschnitten (360  $\mu\text{m}$ ) und der unsicheren Aussage über die tatsächliche Größe des jeweiligen Hippocampus bzw. SVZ für sinnvoller. Außerdem wäre in diesem Fall eine gleiche Größe der Gehirnregionen bei den unterschiedlichen Ratten angenommen worden und hätte somit das Ergebnis wahrscheinlich verzerrt.

Somit verließen wir uns nicht auf eine Approximation der mutmaßlichen Zellzahl, sondern verglichen nur reale absolute Werte miteinander. Hierbei gingen wir folgendermaßen vor:

Summe der Zellzahlen pro Tier und Region

---


$$\frac{\text{Summe der Zellzahlen pro Tier und Region}}{\text{Summe der Einzelflächen aus der jeweiligen Region } [\mu\text{m}^2]} \quad * 100000$$

Durch diese Darstellung erhielten wir die zum Vergleich besser geeignete Dichte der Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Die Mediane (50% - Quantile) der Werte aus jeder einzelnen Gruppe wurden dann miteinander verglichen und graphisch dargestellt (siehe Abschnitt Ergebnisse).

## 9. Konfokales Mikroskop

Zur Analyse der Doppelfärbungen kam ein konfokales Mikroskop (Leitz DMRXE, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland) zum Einsatz, an das verschiedene Komponenten gekoppelt waren:

die eingesetzten Objektträger wurden mit Hilfe einer motorisierten Stage mit der Bezeichnung Multi Control 2000 (Fa. ITK, Lahnau, Deutschland) bewegt, untersucht wurden die Schnitte jeweils zunächst rein lichtmikroskopisch mit Ölimmersionsobjektiven (25x bzw. 40x). Dies hatte den Zweck, einen jeweils passenden Abschnitt für die weitere Analyse innerhalb der Schnitte ausfindig zu machen. Die eigentliche konfokale Darstellung, d.h. die fokale Schnittbildung in räumlich ausgedehnten Objekten, war erst durch einen Laser (Leica

TCSNT, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland), der die Schnittebenen zeilenweise abtastete, und ein entsprechendes Softwareprogramm (Leica Confocal Software, Version 2.61, Fa. Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Deutschland) möglich, welches die einzelnen Schnittebenen wieder übereinander lagerte. Außerdem ermöglichte es mit Hilfe verschiedener Filter die unterschiedlichen Färbungen entweder nebeneinander bzw. auch übereinander gelagert darzustellen, um so die Zellen auf eine Doppelfärbung hin zu untersuchen.

## 10. Auswertung der Daten

### **a) Eigene Methoden**

Auf die Überlegungen zur Auswertung und Darstellung der Daten wurde bereits in den Kapiteln *Stereologiesystem* und *Konfokales Mikroskop* eingegangen.

### **b) Darstellung der Daten und Statistik**

Zur Zusammenfassung der Daten und zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2003 (Microsoft Office) verwendet. In den Graphiken werden jeweils die Medianwerte (50%-Quantile) der einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Hierbei wurde der Medianwert dem Mittelwert in der Darstellung vorgezogen, da sich dieser als robusterer Wert gegenüber Ausreißern erweist. Da bei den Ergebnissen unseres experimentellen Stichprobenumfangs davon ausgegangen wird, dass dieser auf eine allgemeine Grundgesamtheit übertragbar ist, wurde die Darstellung des Standardfehlers des Mittelwerts in den Graphiken der der Standardabweichung vorgezogen. Die Medianwerte sind darüber hinaus in Zahlenwerten neben den Graphiken angegeben. Die Gruppen wurden wie folgt bezeichnet: aCSF für die Versuchstiere, die nur künstliche Zerebrospinalflüssigkeit infundiert bekamen und VEGF10, VEGF10+PEDF10, VEGF10+PEDF20, PEDF10 (nur bei Immunfluoreszenz) und PEDF20, für die Tiere, die Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen bekamen. Die angeführten Zahlenwerte (10 und 20) beziehen sich jeweils auf die Massenkonzentration und haben die Einheit  $\mu\text{g/ml}$ . Die Graphiken wurden nachfolgend zur besseren Darstellbarkeit im Graphikprogramm Photoshop CS (Fa. Adobe) nachbearbeitet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS 12.0. Zum Vergleich der einzelnen Gruppen kamen nicht parametrische Testverfahren wie der *Kruskal-Wallis-Test* (mehrere unabhängige Stichproben) und der *Mann-Whitney-Test* (zwei unabhängige Stichproben) zur Anwendung, da nicht einwandfrei von einer Normalverteilung der Ergebnisse ausgegangen werden konnte und diese in einer solchen Ausgangssituation (voneinander unabhängige Daten) als verlässliche und robuste Tests

gelten. Eine asymptotische Signifikanz von  $p \leq 0,05$  weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen hin und führt dazu, dass die Nullhypothese  $H_0$  verworfen werden muss. Von einem hochsignifikanten Ergebnis spricht man, wenn der p-Wert  $p \leq 0,01$  ist. Bei einem p-Wert von ca. 1 kann von einer Tendenz/Trend, bei Werten von  $1 \leq p \leq 0,5$  von einer deutlichen Tendenz/Trend gesprochen werden.

## D. Ergebnisse

### Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Die Darstellung der Ergebnisse wird im Folgenden zur besseren Interpretation nach Regionen geordnet erfolgen, d.h. es werden zunächst Daten in der SVZ und nachfolgend im Hippocampus dargestellt.

Insgesamt wurden bei den immunhistochemischen Färbungen **504** einzelne Schnitte ausgewertet, in denen im Ganzen **82454** Zellen gezählt wurden.

Bei der Immunfluoreszenz wurden wie beschrieben pro Tier und Färbung 100 Zellen differenziert, d.h. bei einer Anzahl von 6 Gruppen á 6 Tieren bedeutet dies eine Zellzahl von:  
 $100 \cdot 36 = 3600$  Zellen

Da zwei Doppelfärbungen ausgewertet wurden bedeutet dies insgesamt eine Zellzahl von **7200**.

Im Rahmen dieser Arbeit mussten also am Ende **89654** Zellen beurteilt werden.

#### a) Subventrikulärzone (SVZ)

##### I. BrdU

Die Integration des BrdU in die DNA stellt sich morphologisch als dunkelbraune bis schwarze punktförmige Anfärbung des Zellkerns dar (siehe *Abb.8*). Der Bereich, in dem die Zellzahl ermittelt wurde, umfasste dabei die gesamte SVZ der lateralen Seitenventrikel (siehe *Abb.8c*).

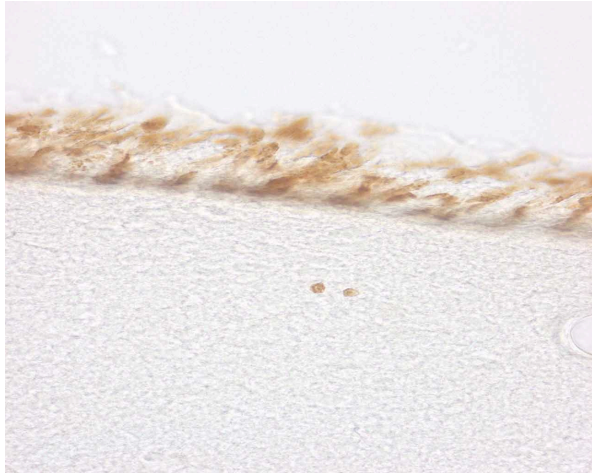
Folgende Ergebnisse konnten bei der BrdU-Färbung in der SVZ festgestellt werden:

Die Gruppen VEGF10 und VEGF10+PEDF10 zeigten eine sichtbare, aber nicht signifikante Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur Gruppe aCSF (Kontrollgruppe / p-Wert in beiden Fällen 0,749).

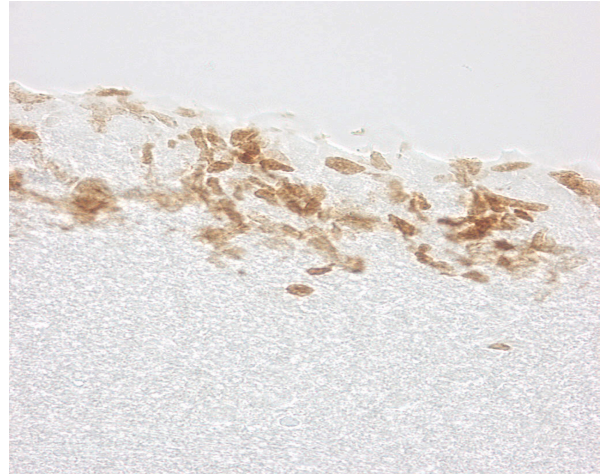
Bei den Gruppen VEGF10+PEDF20 und PEDF20 zeigte sich eine Tendenz zum Anstieg der Zellzahl gegenüber der Gruppe aCSF (p-Wert in beiden Fällen 0,109).

Ein **signifikanter** Anstieg zeichnete sich zwischen den Gruppen VEGF10+PEDF20 und VEGF10+PEDF10 ab ( $p=0,037$ ), wobei ein tendenzieller Anstieg auch im Vergleich zur Gruppe VEGF10 vorhanden war ( $p=0,109$ ).

Der Anstieg der Zellzahl in der Gruppe PEDF20 gegenüber den Gruppen VEGF10 und VEGF10+PEDF10 zeigte einen robusten Trend (p-Werte 0,078 bzw. 0,055).



**a**



**b**



**c**

**Abb. 8:**

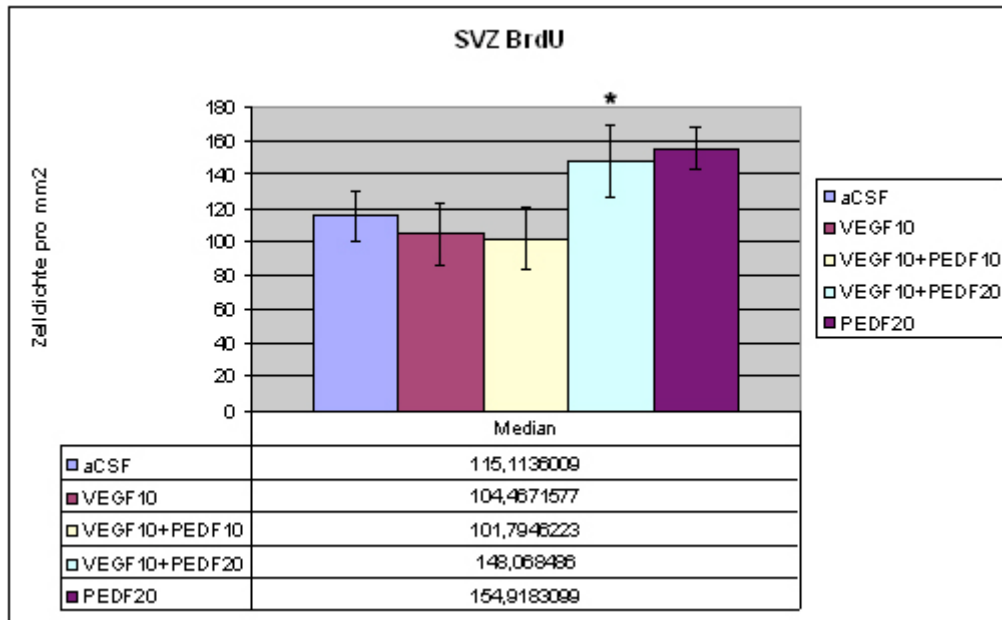
BrdU-Färbung in der SVZ

(a) Kontrollgruppe mit aCSF; Vergrößerung 40x

(b) Gruppe PEDF20, Vergrößerung 40x

(c) Ausschnitt eines rechten Seitenventrikels: auf der Bildseite links ist die laterale Wand des Seitenventrikels erkennbar; Vergrößerung 4x





**Abb. 9:** BrdU-Färbung in der SVZ

\* :  $p=0,037$  zwischen den Gruppen VEGF10/PEDF20 und VEGF10/PEDF10

## **II. DCX**

Da der DCX-Antikörper Tubulinstrukturen innerhalb der Zelle anfärbt wird im Gegensatz zu BrdU nicht der Zellkern, sondern eher die Peripherie inklusive dem Zellsoma und sämtlichen Ausläufern wie Dendriten und Axonen gefärbt. Auch hier handelt es sich um eine dunkelbraune bis schwarze Anfärbung (*Abb.10*). Gezählt wurden nur eindeutig erkennbare Zellsomata mit dazugehörigen Dendriten bzw. Axonen. Hiermit sollte eine doppelte Zählung nur einfach vorhandener Zellen und die Zählung möglicher Artefakte der Färbung verhindert werden.



**Abb. 10:**

DCX-Färbung in der SVZ, Vergrößerung 40x

Folgende Beobachtungen wurden bei der DCX-Färbung in der SVZ gemacht:

VEGF10 zeigte einen sichtbaren, aber nicht signifikanten Anstieg der Zellzahl gegenüber der

Gruppe aCSF ( $p=0,423$ ).

Bei VEGF10+PEDF10 konnte eine nicht signifikante Abnahme der Zellzahl gegenüber VEGF10 ( $p=0,423$ ) beobachtet werden, sodass ein ungefähr gleiches Niveau mit der Zellzahl der Gruppe aCSF erreicht wurde.

VEGF10+PEDF20 führte noch nicht zu einem signifikanten Anstieg der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe (aCSF /  $p=0,631$ ).

Eine fast signifikanter Anstieg ließ sich jedoch zwischen der Gruppe PEDF20 und aCSF beobachten ( $p=0,055$ ).

Auch gegenüber VEGF10+PEDF10 zeigte PEDF20 einen robusten Trend zur ansteigenden Zellzahl ( $p=0,078$ ).

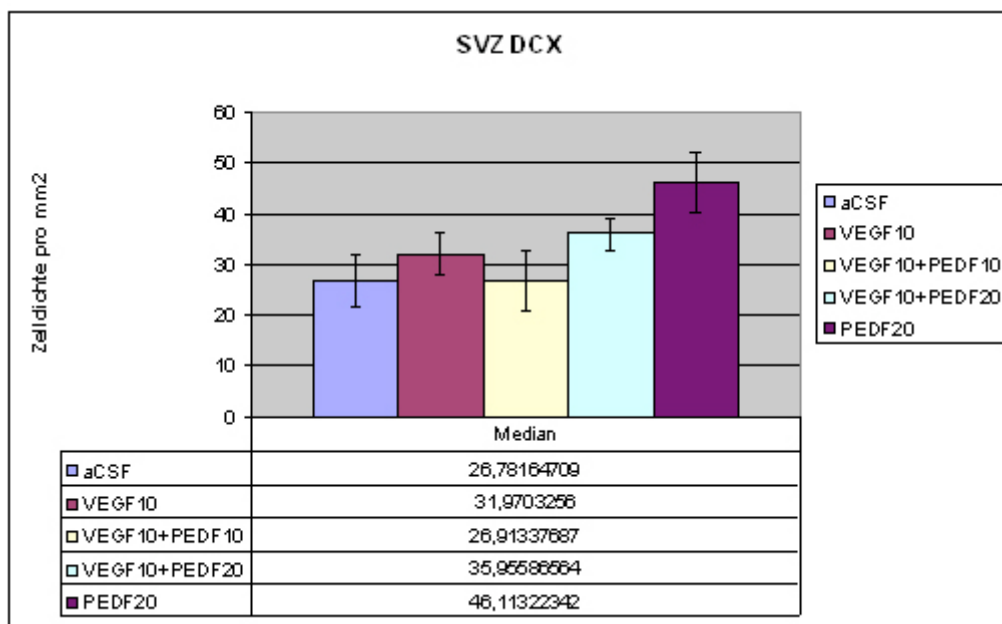


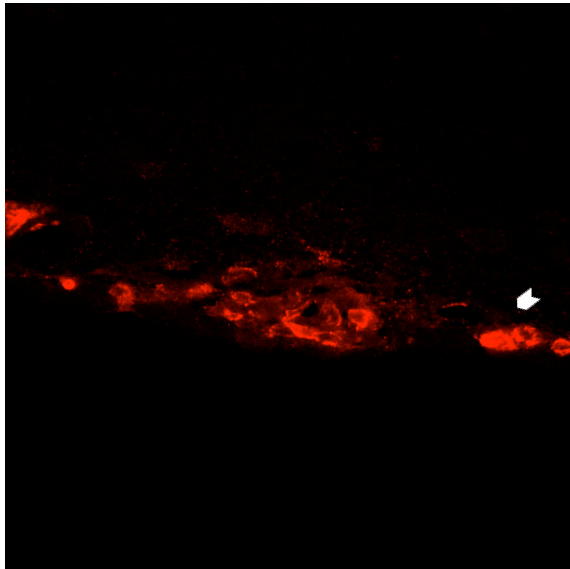
Abb. 11: DCX- Färbung in der SVZ

### **III. Immunfluoreszenz – Doppelfärbung**

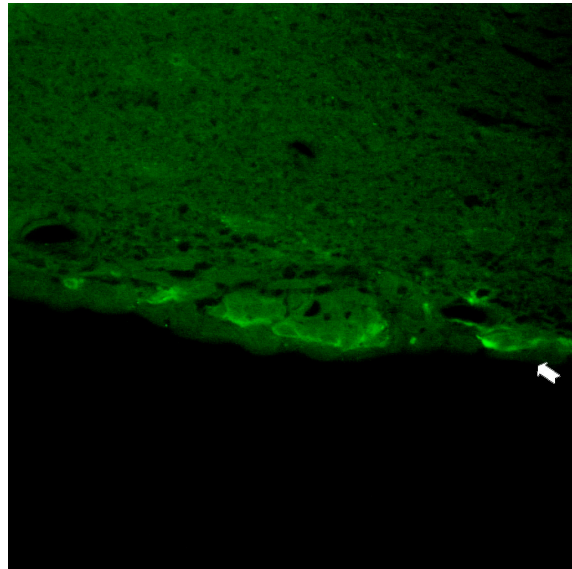
#### **a) TUJ-1/BrdU**

Bei folgenden Experimenten wurden fluoreszierende Antikörper verwendet, die Zellantigene in unterschiedlichen Farben erscheinen ließen; so stellte sich BrdU *rot* (Abb. 12a) und TUJ-1 *grün* (Abb. 12b) dar. Mit Hilfe der Konfokalmikroskopie wurden dann jeweils 100 Zellen eines Tieres darauf untersucht, wie viele Zellen eine Doppelfärbung, d.h. sich gelb rekonstruieren ließen, um daraufhin auf den Anteil der bereits zu Neuronen differenzierten Zellen zu schließen. In den Diagrammen wurden nur die doppelgefärbten Zellen pro 100 Zellen angegeben.

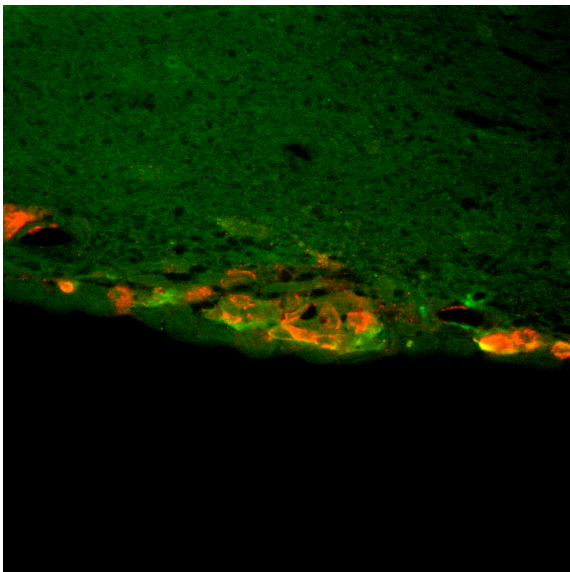
Bei der Auswertung der Daten in der SVZ konnte hierbei allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden.



**a**



**b**



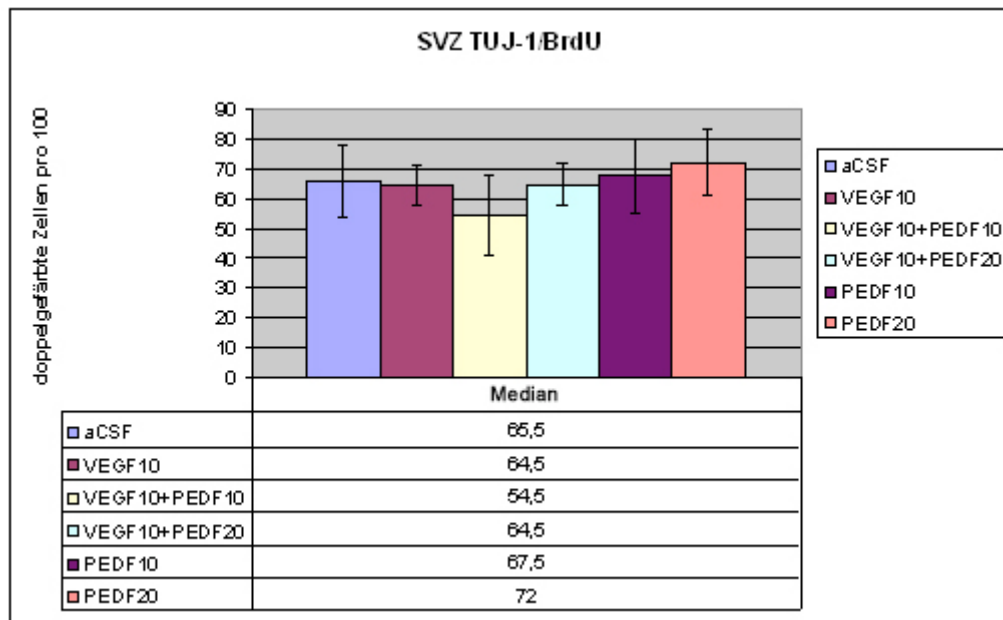
**c**

**Abb. 12:** Doppelfärbung TUJ-1/ BrdU in der SVZ

(a) rot: BrdU-gefärbte Zellen (Pfeil), Vergrößerung 40x, Ölimmersion

(b) grün: TUJ-1 gefärbte Zellen (Pfeil), Vergrößerung 40x, Ölimmersion

(c) Fusion der beiden Kanäle a+b



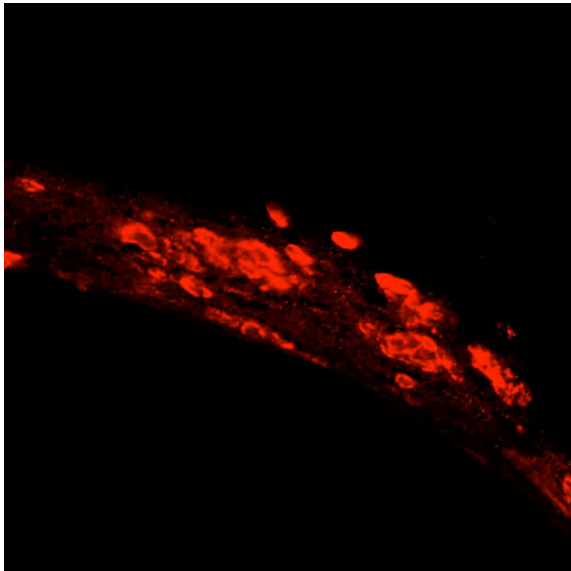
**Abb. 13:** Doppelfärbung TUJ-1/BrdU in der SVZ

#### **b) GFAP/BrdU**

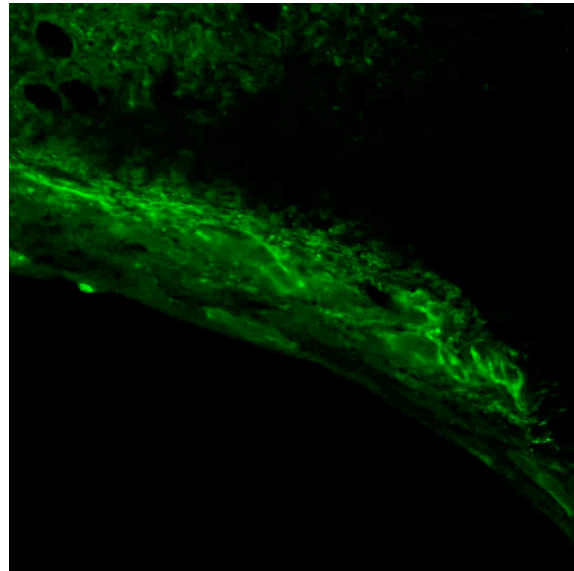
Neben der Differenzierung in Richtung der Neurone sollte durch die zweite Doppelfärbung untersucht werden, ob und wenn ja welchen Effekt die beiden Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung zu Gliazellen haben. Hierzu verwendeten wir den Astrozytenmarker GFAP. Auch hier wurde durch fluoreszierende Antikörper eine unterschiedliche Anfärbung der Epitope BrdU und GFAP erreicht. Die BrdU-Markierung war anhand der *roten* (s.o.), die GFAP-Markierung anhand der *grünen* (Abb. 14) Farbe erkennbar.

In der SVZ zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen VEGF10 und aCSF bzw. VEGF10+PEDF10 und aCSF, allerdings ein nahe an der Signifikanzgrenze liegender Anstieg der Differenzierung zwischen VEGF10+PEDF20 und aCSF ( $p=0,055$ ).

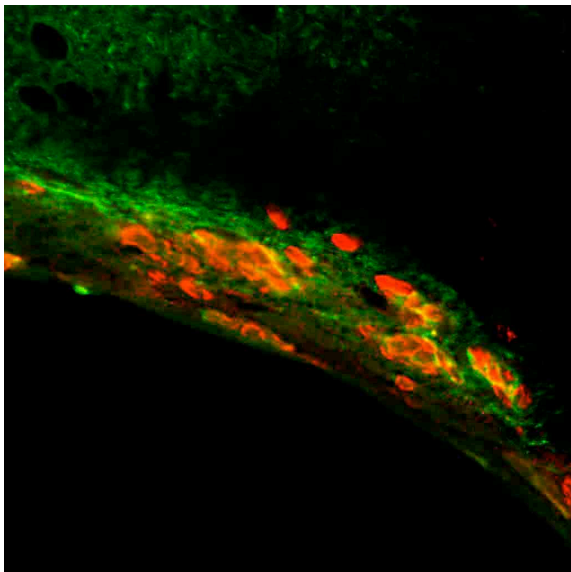
Zwischen den Gruppen PEDF20 und aCSF zeigte sich ein **signifikanter** Anstieg in der Differenzierung zu Gliazellen ( $p=0,02$ ), der ebenfalls zwischen den Gruppen PEDF10 und VEGF10 ( $p=0,006$ ) bzw. zwischen PEDF10 und VEGF10+PEDF10 ( $p=0,03$ ) zu erkennen war.



**a**



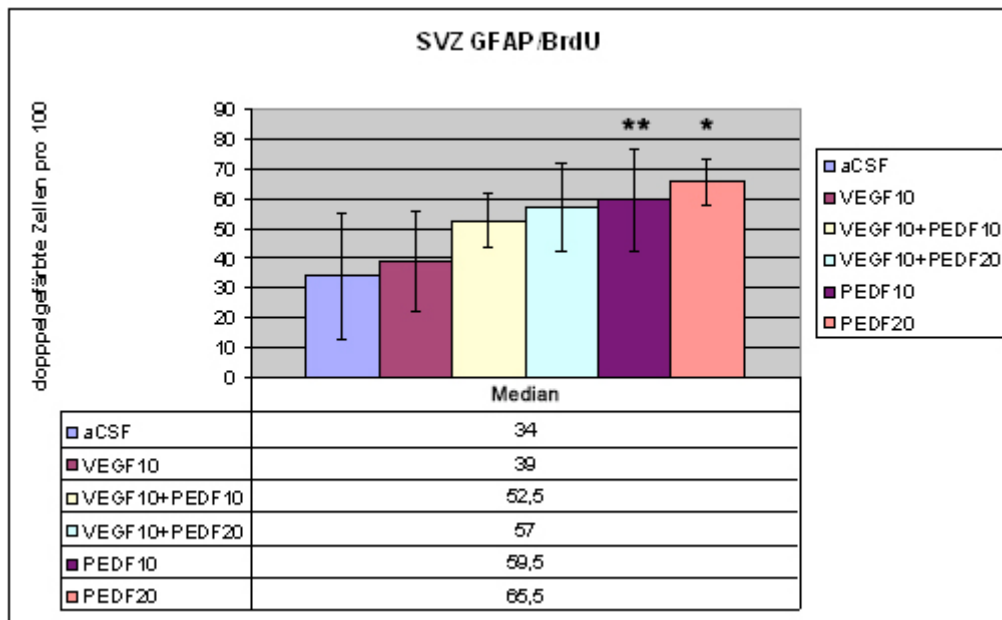
**b**



**c**

**Abb. 14:** Doppelfärbung GFAP/ BrdU in der SVZ

- (a) rot: BrdU-gefärbte Zellen (Pfeil), Vergrößerung 40x, Ölimmersion
- (b) grün: GFAP gefärbte Zellen (Pfeil), Vergrößerung 40x, Ölimmersion
- (c) Fusion der beiden Kanäle a+b



**Abb. 15:** Doppelfärbung GFAP/BrdU in der SVZ

\* = signifikante Unterschiede, \*\* = hochsignifikante Unterschiede

PEDF20 und aCSF ( $p=0,02$ ), PEDF10 und VEGF10 ( $p=0,006$ ), PEDF10 und VEGF10/PEDF10 ( $p=0,03$ )

## **b) Hippocampus**

### **I. BrdU**

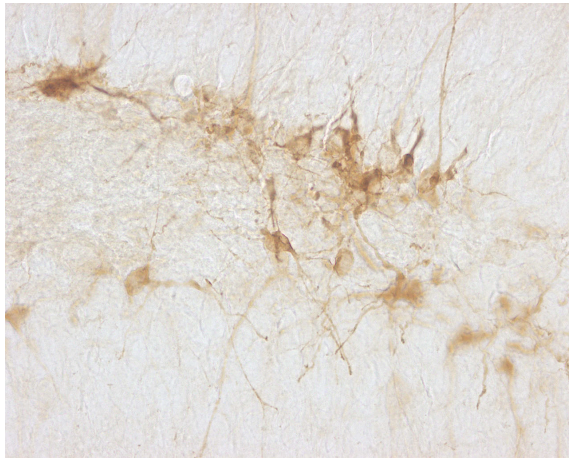
Innerhalb des Hippocampus wurde zunächst der Gyrus dentatus vermessen und danach die Zelldichte innerhalb der SGL (Subgranular Layer) bestimmt. Das typische Aussehen dieser Region ist in *Abb. 16c* zu erkennen.

Die Zelldichte änderte sich in Abhängigkeit der zugegebenen Faktoren wie folgt:

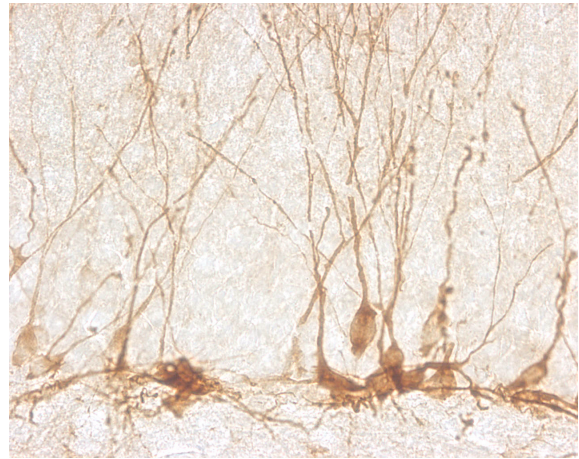
Die Gruppe VEGF10 zeigte eine Tendenz beim Anstieg der Zelldichte gegenüber aCSF ( $p=0,1$ ).

Bei der Kombination der beiden Faktoren, also in den Gruppen VEGF10+PEDF10 und VEGF10+PEDF20 fiel der Anstieg der Zelldichte nicht signifikant aus ( $p$ -Werte 0,855/0,316). PEDF20 bewirkte allerdings gegenüber der Kontrollgruppe einen **signifikanten** Anstieg in der Zelldichte ( $p=0,011$ / siehe auch *Abb. 16a/b*), der Anstieg von PEDF20 gegenüber VEGF10+PEDF10 fiel nicht signifikant aus.





**a**



**b**



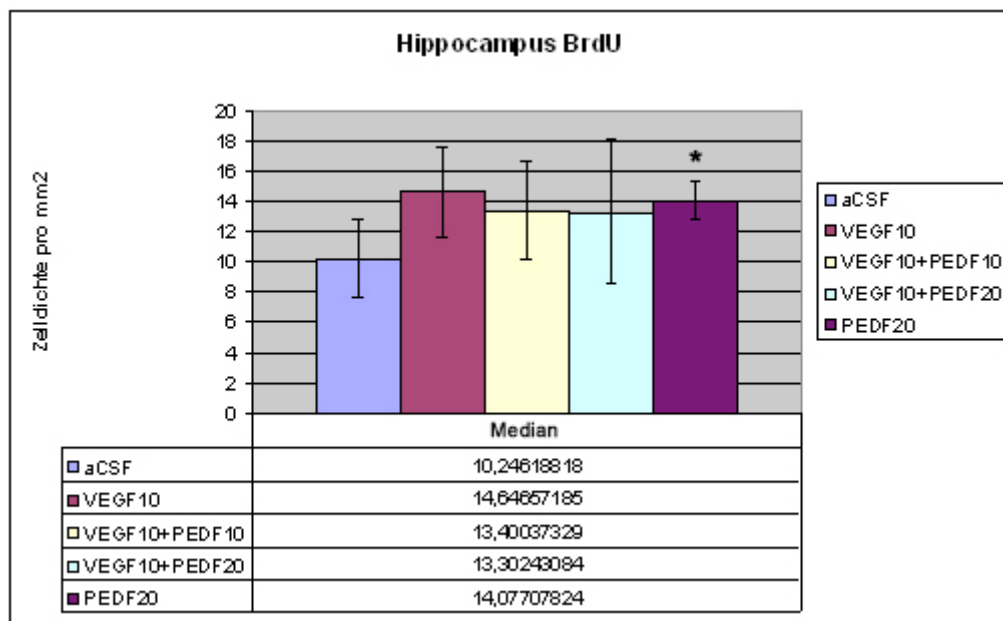
**c**

**Abb. 16:** DCX-Färbung Hippocampus

(a) Kontrollgruppe mit aCSF, Vergrößerung 40x

(b) Gruppe PEDF20 Vergrößerung 40x

(c) Übersichtsbild Hippocampus mit immunopositiven Zellen für DCX



**Abb. 17:** BrdU-Färbung im Hippocampus

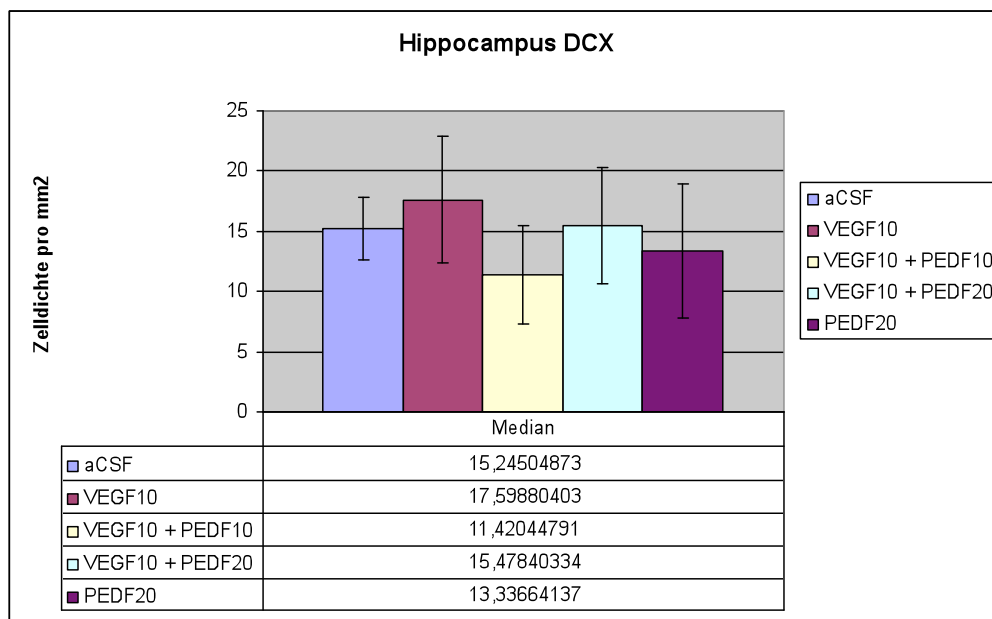
\* :  $p=0,011$  zwischen den Gruppen PEDF20 und aCSF

## **II. DCX**

Im Hippocampus konnte beobachtet werden, dass VEGF zu einer sichtbaren Steigerung der Zellzahl führte, die allerdings auf Grund der hohen Standardabweichung nicht signifikant ausfiel.

VEGF10+PEDF10 zeigte sowohl gegenüber der Kontrollgruppe als auch hinsichtlich der Gruppe VEGF eine tendenzielle Abnahme der Zelldichte (p-Wert in beiden Fällen 0,109). Zwischen den Gruppen VEGF10+PEDF20 und VEGF10+PEDF10 bzw. PEDF20 und VEGF10+PEDF10 konnte zwar graphisch einen Unterschied dargestellt werden, welcher aber nicht signifikant ausfiel.

Somit kann als einzig verwertbares Ergebnis dieses Teilbereichs die Abnahme der Zelldichte bei VEGF10+PEDF10 gegenüber der Kontrollgruppe angesehen werden.



**Abb. 18:** DCX-Färbung im Hippocampus

## **III. Immunfluoreszenz – Doppelfärbungen**

### ***a) TUJ-1/BrdU***

Bei der Doppelfärbung mit BrdU und dem Marker für Neuronen in einem frühen Entwicklungsstadium TUJ-1 konnten innerhalb des Hippocampus folgende Unterschiede festgestellt werden:

**Signifikant** weniger Zellen wiesen innerhalb der Gruppe VEGF10+PEDF10 im Vergleich zur Kontrolle eine Doppelfärbung auf ( $p=0,037$ ). Ein Trend bestand ebenfalls zwischen den Gruppen VEGF10 und aCSF ( $p=0,108$ ).

Zwischen VEGF10 und VEGF10+PEDF10 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p=0,936$ ).



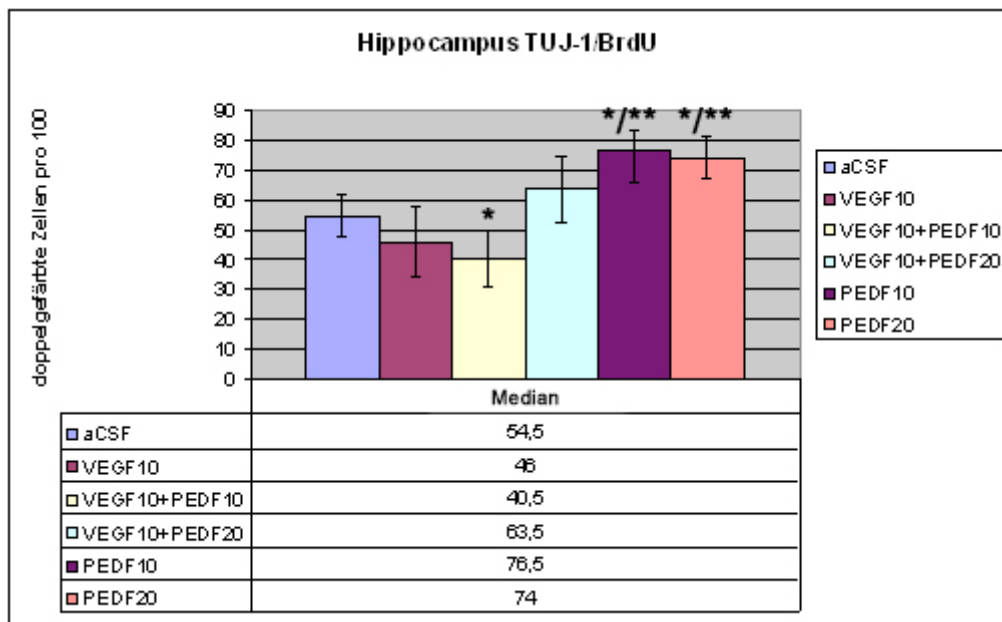
VEGF10+PEDF20 zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe einen deutlichen Trend zu mehr doppelgefärbten Zellen ( $p=0,092$ ).

VEGF10+PEDF20 führte zu **signifikant** mehr doppelgefärbten Zellen im Vergleich zu VEGF10+PEDF10 ( $p=0,007$ ) und zu VEGF10 ( $p=0,014$ ).

PEDF10 führte zu einem **signifikanten** Anstieg gegenüber aCSF ( $p=0,006$ ).

PEDF20 zeigte in dieser Hinsicht denselben Effekt ( $p=0,006$ ).

Im Vergleich zur Gruppe VEGF10+PEDF20 führten sowohl PEDF10 als auch PEDF20 zu einem **hochsignifikanten** Anstieg der Doppelfärbungen. ( $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ).



**Abb. 19:** Doppelfärbung TUJ-1/BrdU im Hippocampus

\* = signifikante Unterschiede, \*\* = hochsignifikante Unterschiede

VEGF10/PEDF10 und aCSF ( $p=0,037$ ), PEDF10 und aCSF ( $p=0,006$ ), PEDF20 und aCSF ( $p=0,006$ ), PEDF10 und VEGF10/PEDF20 ( $p=0,004$ ), PEDF20 und VEGF10/PEDF20 ( $p=0,006$ )

#### **b) GFAP/BrdU**

Auch im Hippocampus wurden Doppelfärbungen durchgeführt um die Auswirkungen der Wachstumsfaktoren VEGF und PEDF auf die Differenzierung von Stammzellen zu Astrozyten zu untersuchen.

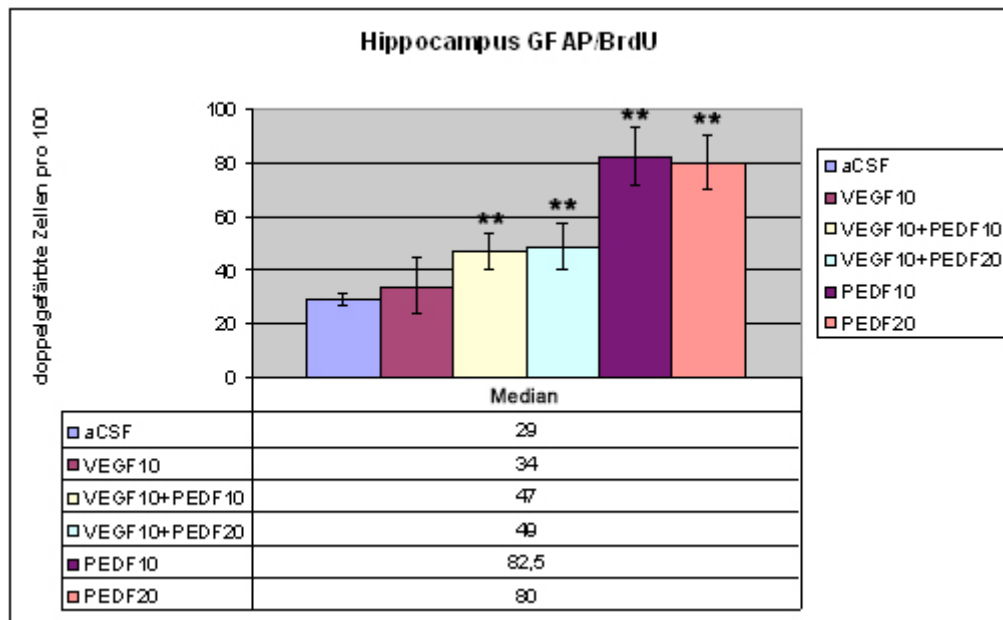
Folgende Beobachtungen konnten gemacht werden:

VEGF10 führte gegenüber aCSF zu keinem signifikanten Unterschied ( $p=0,629$ ).

Sowohl VEGF10+PEDF10 als auch VEGF10+PEDF20 führten im Vergleich zu aCSF zu einem **signifikanten** Anstieg der Doppelfärbungen ( $p$ -Werte in beiden Fällen 0,004).

Die Gruppen, die allein den Faktor PEDF enthielten, wiesen in beiden Fällen (PEDF10, PEDF20) einen **signifikanten** Anstieg gegenüber aCSF auf ( $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ).

Denselben Anstieg bewirkten diese beiden Gruppen auch gegenüber VEGF10+PEDF20 ( $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ).



**Abb. 20:** Doppelfärbung GFAP/BrdU im Hippocampus

\*\* = hochsignifikante Unterschiede

VEGF10/PEDF10 und aCSF ( $p=0,004$ ), VEGF10/PEDF20 und aCSF ( $p=0,004$ ), PEDF10 und aCSF ( $p=0,004$ ), PEDF20 und aCSF ( $p=0,006$ ), PEDF10 und V10+P20 ( $p=0,004/0,006$ )

# E. Diskussion

## 1. Einleitung

Viele Effekte der beiden Faktoren PEDF und VEGF wurden bereits von anderen Forschungsgruppen untersucht, so z.B. die Auswirkungen von PEDF in der SVZ (Ramirez-Castillejo et al, 2006) und die von VEGF in der SVZ und im Hippocampus (Jin et al., 2002; Schänzer et al., 2004).

Folgende Betrachtungen wurden allerdings vorher noch nie von anderen Gruppen vorgenommen:

- Die Auswirkungen von PEDF auf die Neurogenese und Differenzierung im Hippocampus
- Die Interaktion von PEDF und VEGF in der SVZ und im Hippocampus

Deshalb sollen im Folgenden die oben aufgeführten Ergebnisse nach dem dort bereits angewandten Schema interpretiert und, soweit möglich, mit den Resultaten anderer Forschungsgruppen in der Literatur verglichen werden.

## 2. Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den vorangegangenen *in vitro* Versuchen

Vor den hier dargestellten *in vivo* Versuchen untersuchten andere Mitarbeiter unserer Forschungsgruppe bereits die Auswirkungen von VEGF und PEDF auf die Neurogenese und Differenzierung von *kultivierten* Stammzellen aus der SVZ. Hierzu wurden die Zellen der SVZ aus Rattengehirnen entnommen und kultiviert um aus ihnen Neurosphären wachsen zu lassen. Daraufhin wurden die Zellen alle zwei Tage über den Zeitraum von einer Woche mit unterschiedlich konzentrierten Wachstumsfaktoren (VEGF 50µg/ml, PEDF 10µg/ml, PEDF 50µg/ml, PEDF 100µg/ml) und deren Kombinationen (VEGF 50µg/ml + PEDF 50µg/ml) behandelt. Anschließend wurde auch hier mit Hilfe einer BrdU-Färbung die absolute Zellzahl und bei einer Doppelfärbung mit TUJ-1/BrdU und GFAP/BrdU der proportionale Anteil der doppelgefärbten Zellen mit der Kontrollgruppe verglichen (Pina et al, unpublished data).

Verglichen werden sollen die Ergebnisse hinsichtlich der Neurogenese und Differenzierung neuronaler Stammzellen:

### a) Neurogenese

- VEGF führt weder in *in vitro* noch *in vivo* zu einer gesteigerten Neurogeneserate.

- PEDF führt bei einer Konzentration von 20µg/ml *in vivo* zu einem deutlichen Anstieg der Neurogenese. Diese Konzentration wurde *in vitro* nicht verwendet. Hier kam es allerdings bereits ab einer Konzentration von 10µg/ml zu einer dezenten, ab einer Konzentration von 50µg/ml dann aber zu einer eindeutigen Steigerung der Neurogeneserate.
- Wurde VEGF und PEDF simultan in gleicher Konzentration appliziert, so wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der neurotrophe Effekt von PEDF reduziert. Steigerte man allerdings die Konzentration von PEDF, bzw. applizierte man PEDF allein, so kam es erneut zu einer Steigerung der Neurogenese.

#### **b) Differenzierung**

- Sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Versuche lieferten keine aussagekräftigen Ergebnisse bei der TUJ-1 Doppelfärbung in der SVZ.
- Für VEGF konnte kein differenzierungsfördernder Effekt in der GFAP-Färbung nachgewiesen werden.
- PEDF führte sowohl in Kultur als auch *in vivo* zu einem **signifikanten** Anstieg differenzierter GFAP-positiver Zellen. *In vivo* war dieser Effekt bereits bei einer Konzentration von 10µg/ml erkennbar, welche *in vitro* nicht untersucht wurde. Hier war die geringste Konzentration von PEDF 50µg/ml.
- Wurde VEGF und PEDF simultan in gleicher Konzentration appliziert, so wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* der trophische Effekt von PEDF reduziert. Steigerte man allerdings die Konzentration von PEDF, bzw. applizierte man PEDF allein, so kam es erneut zu einer Steigerung der Differenzierung.

In der experimentellen Forschung werden oft Versuche zunächst in Kultur durchgeführt und erst im Folgenden werden bei interessanter Datenlage Versuche an lebenden Tieren angeschlossen, um zu bestätigen, dass die Ergebnisse auch für den lebendigen Organismus zutreffen. Sowohl was die Untersuchung der Neurogenese als auch die der Differenzierung angeht, zeigten unsere *in vitro* und *in vivo* Versuche viele Übereinstimmungen und es erübrigt sich deshalb eine Diskussion über mögliche Gründe im Abweichen der Ergebnisse beider Versuchsansätze.

### 3. Auswirkungen des Wachstumsfaktors PEDF auf die Neurogenese und Differenzierung

#### **a) in der Subventrikulärzone**

Die Grundlage für die Untersuchung der Auswirkungen von PEDF im Bereich der SVZ beruht auf der These, dass die Selbsterneuerung und Differenzierung von neuronalen Stammzellen und Vorläuferzellen durch bestimmte „Umweltbedingungen“ in den Bereichen der adulten Neurogenese reguliert wird (Pumiglia et al., 2006). PEDF kommt, wie andere Faktoren auch, in einer sog. „Stammzellnische“ vor, deren Existenz seit einigen Jahren postuliert wird (Palmer et al., 2000). Hierbei handelt es sich um ein entwicklungsgeschichtliches Kommunikationssystem zwischen vaskulären und neuronalen Geweben, wobei Faktoren, die entweder von Endothel- oder auch von Ependymzellen sezerniert werden, parakrin die umliegenden neuronalen Stammzellen beeinflussen.

Zunächst sollte durch die Beurteilung der BrdU-Färbung festgestellt werden, wie viele Zellen im Zeitraum von einer Woche neu entstanden sind. Unsere Ergebnisse belegen eindeutig, dass PEDF in diesem Zeitraum zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl gegenüber der Kontrollgruppe, die nur mit aCSF behandelt wurde, führte (*Abb. 21a*).

In dieser Hinsicht stimmen wir mit den aktuellen Studien überein, die erst vor kurzem mit einer ähnlichen Fragestellung über die Auswirkungen von PEDF in der SVZ durchgeführt wurden. Auch diese Forschergruppe (Ramirez-Castillejo et al., 2006) stellte eine deutliche Zunahme BrdU-positiver Zellen bei solchen Tieren fest, die am letzten Tag der einwöchigen Testphase sieben Mal jeweils alle zwei Stunden intraperitoneal BrdU appliziert bekommen hatten.

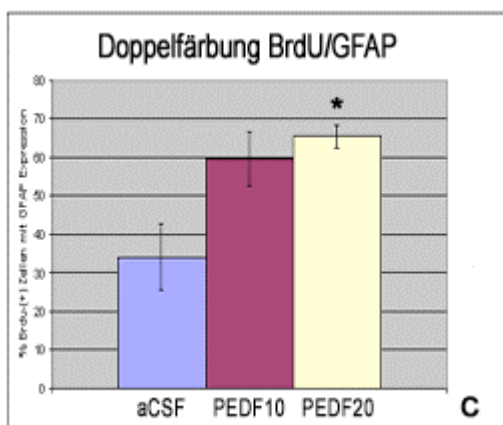
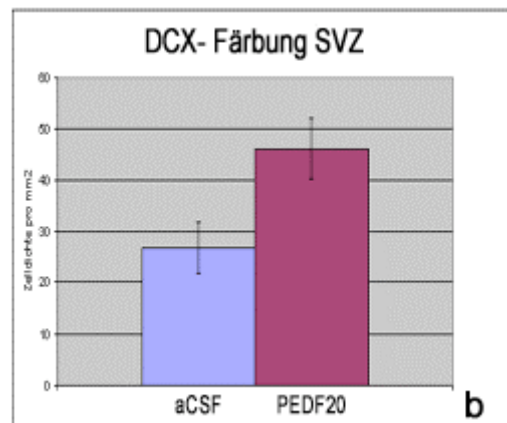
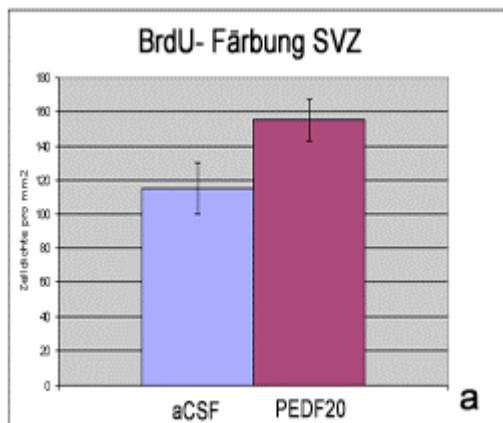
Da durch die BrdU Färbung zwar neu entstandene Zellen zuverlässig markiert werden können, aber allein durch diesen Marker keine Aussage über die Eigenschaften bzw. den Differenzierungsgrad getroffen werden kann, untersuchten wir die Auswirkungen von PEDF auf die neuronale Differenzierung zusätzlich mit Hilfe des Neuronenmarkers DCX und einer Doppelfärbung mit BrdU und dem Neuronenmarker TUJ1. Unsere Ergebnisse sahen wie folgt aus:

PEDF führte zu einem Anstieg der Zelldichte bei DCX-positiven Neuroblasten, auch A-Zellen genannt (Alvarez-Buylla et al., 1994), die in diesem Zustand in den Bulbus olfactorius wandern, um sich dort zu Interneuronen zu differenzieren (Doetsch, 2003; Doetsch et al., 1997,1999) (*Abb. 21b*). Man kann daraus folgern, dass PEDF nicht nur eine vermehrte Proliferation von Stammzellen fördert, sondern auch zu einer gesteigerten Differenzierung in

Richtung von neuronalen Zellen führt. Zu diesem Zweck wurde auch die Doppelfärbung BrdU/TUJ1 durchgeführt. TUJ1 repräsentiert dabei einen noch unreiferen neuronalen Differenzierungsgrad als DCX. Anders als im Hippocampus konnte in der SVZ hierbei allerdings kein signifikanter Anstieg neuronaler Zellen nach der Applikation von PEDF festgestellt werden. Eine DCX Färbung wurde von Ramirez-Castillejo et al. nicht durchgeführt, eine *in Kultur* vorgenommene TUJ1 Färbung zeigte eine deutliche Steigerung von TUJ1-positiven Zellen bei Kulturen, die vorher mit PEDF behandelt worden sind (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

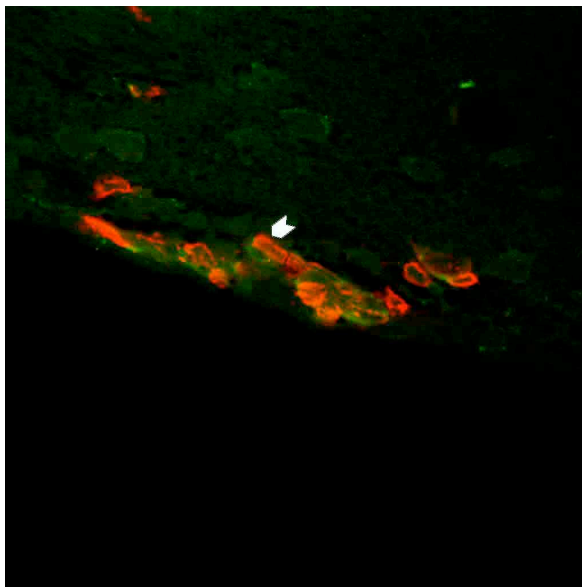
Um zu beurteilen, ob sich dieser Effekt auch auf andere Gewebe in diesem Bereich, so z.B. Gliazellen, übertragen lässt, führten wir eine Doppelfärbung BrdU/GFAP durch, wobei hier PEDF einen **signifikanten** Anstieg doppelgefärbter Zellen (65,5% der Zellen gegenüber 35% der Zellen bei aCSF;  $p=0,02$ ) bewirkte (*Abb. 21c; Abb. 22a/b*). Dies belegt, dass der trophische Effekt nicht nur auf eine Differenzierungsrichtung beschränkt ist, sondern auch die Entstehung von GFAP-positiven Zellen beeinflusst. Zu bedenken bleibt bei diesen Ergebnissen allerdings die Theorie, dass GFAP-positive astrozytenähnliche Zellen evtl. einen Pool sog. B-Zellen (Alvarez-Buylla et al., 1994) darstellen, d.h. neuronale Vorläuferzellen, welche lange Zellzyklen aufweisen und aus denen sich wiederum A- und C-Zellen entwickeln könnten. Allerdings konnte die oben genannte Forschergruppe um Ramirez-Castillejo nachweisen, dass PEDF *spezifisch* die Selbsterneuerung der GFAP-positiven B-Zellen, also der frühesten und undifferenziertesten der neuronalen Vorläuferzellen, stimuliert, dabei aber keinen Einfluss auf die C- und die A-Zellen ausübt. Außerdem stellten sie fest, dass PEDF die Proliferation zwar stimulierte, aber kein entscheidender Faktor für das Überleben der B-Zellen darstellte (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

Da diese Zellen per definitionem in einem möglichst undifferenzierten Zustand sind, untersuchten Ramirez-Castillejo und Kollegen, ob PEDF dazu beiträgt, diese Zellen in einem solchen Stadium zu halten. Es konnte nachgewiesen werden, dass PEDF in zweifacher Hinsicht den Zustand der B-Zellen beeinflusst: erstens führte PEDF über Notch-Rezeptoren zu einer vermehrten Expression der Transkriptionsinhibitoren *Hes1* und *Hes5* und damit konsekutiv zu einer verminderten Bildung von helix-loop-helix Strukturen, die für die Differenzierung wichtig sind. Zweitens wurden HMG-Box Transkriptionsfaktoren der SoxB-Familie hoch reguliert, die einer Differenzierung von Stammzellen entgegenwirken, indem sie bHLH proneuronale Faktoren inhibieren. Daraus wurde gefolgert, dass PEDF einen Undifferenzierungseffekt auf neuronale Vorläuferzellen ausübe (Ramirez-Castillejo et al., 2006).

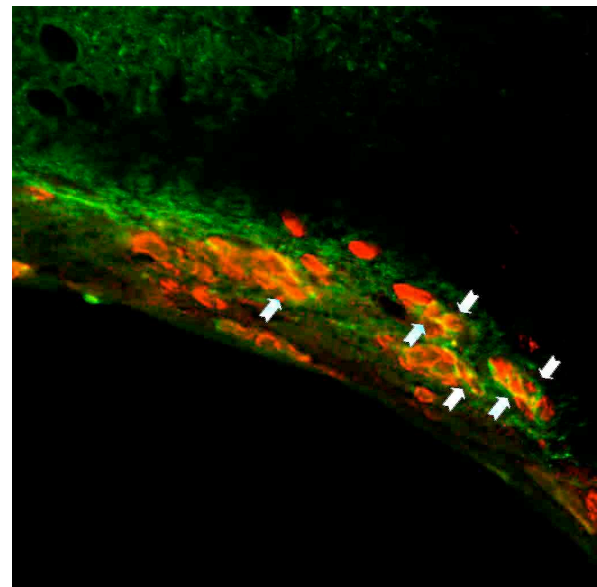


**Abb. 21:** Auswirkungen von PEDF in der SVZ

- (a) BrdU-(+) Zellen in der SVZ
  - (b) DCX-(+) Zellen in der SVZ
  - (c) Anteil der GFAP-(+) Zellen an den BrdU-(+) Zellen in der SVZ
- \* = signifikanter Unterschied  
 $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe



**a**



**b**

**Abb. 22:** Doppelfärbung BrdU/GFAP in der SVZ

- (a) Kontrollgruppe, Vergrößerung 40x (Ölimmersion); der Pfeil bezeichnet die einzige doppelgefärbte Zelle
- (b) Gruppe PEDF20, Vergrößerung 40x (Ölimmersion); die Pfeile weisen auf die im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich größere Anzahl doppelgefärbter Zellen hin.

## **b) im Hippocampus**

Bisher wurde der Hippocampus, einem weiteren Ort der Neurogenese, von Ramirez-Castillejo und Kollegen nicht untersucht. Hier konnten wir zunächst denselben Effekt von PEDF in noch stärkerer Weise als in der SVZ nachweisen. Die Dichte der BrdU-positiven Zellen nahm in der PEDF20-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe **signifikant** zu ( $p=0,011$ ) (*Abb. 23a*). Hierbei ist es nicht möglich zu unterscheiden, wie viele der markierten Zellen tatsächlich Neurone sind oder anderen Zelltypen wie beispielsweise Endothelzellen zuzurechnen sind.

Dies erklärt unter Umständen auch, warum PEDF nicht zu einem signifikanten Anstieg von DCX-positiven Zellen führte, da der Anstieg von BrdU-positiven Zellen nicht unbedingt einen Anstieg der Neuronenzahl abgebildet hat. Weiterhin kann bei der DCX-Färbung nicht zweifelsfrei festgestellt werden, wie viele Zellen tatsächlich erst nach der Gabe von PEDF neu entstanden sind. Eine BrdU/DCX Doppelfärbung wäre hierbei hilfreich gewesen, konnte aber aus methodologischen Gründen nicht in die Arbeit integriert werden.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass es sich beim Hippocampus zwar auch um einen Ort vermehrter Neurogenese handelt, dieser aber nicht zwangsläufig dasselbe Mikroumfeld wie die SVZ aufweisen muss. Ramirez-Castillejo selbst gibt in seiner Veröffentlichung zu bedenken, dass die Eigenschaften und die Aktivität von PEDF evtl. durch extrazelluläre Matrixproteine wie z.B. Kollagen-I beeinflusst werden könnten, da PEDF hierfür spezifische Bindungsstellen aufweist (Ramirez-Castillejo et al., 2006). Als weitere Möglichkeit bleibt offen, dass die Zeit von einer Woche in diesem Umfeld für die neuronalen Vorläuferzellen vielleicht nicht ausreichend war, um einen solchen Differenzierungsgrad zu erreichen. Als letzter Punkt bleibt außerdem fraglich, ob die intraventrikulär applizierten Wachstumsfaktoren tatsächlich in ausreichendem Maß den Hippocampus erreicht haben. Untersuchungen haben gezeigt, dass z.B. die Konzentration von radioaktiv markiertem und intraventrikulär appliziertem BDNF in angrenzenden Bereichen des Gehirns extrem schnell abnimmt, da die Passage durch die Blut-Hirn-Schranke stark beeinträchtigt wird (Schlachetzki et al., 2004).

Auch im Hippocampus konnten **hochsignifikant** höhere Anteile an BrdU/GFAP-doppelgefärbten Zellen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (PEDF10 82,5%, PEDF20 80%, aCSF 29%;  $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ) (*Abb.23b, Abb.24a,b*). Interessanterweise ergab sich allerdings im Vergleich zur SVZ auch ein deutlich höherer Anteil an TUJ1-positiven Zellen (PEDF10 76,5%, PEDF20 74%, aCSF 54,5%;  $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ), d.h. hier hat bereits eine Differenzierung in die neuronale Richtung stattgefunden (*Abb.23c, Abb.25a,b*). Hieraus ergeben sich folglich interessante Ansätze zur Interpretation: neben dem Undifferenzierungseffekt von PEDF kommt bereits innerhalb der ersten Woche der positive



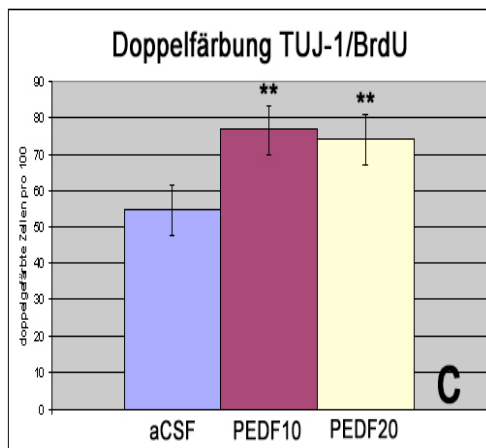
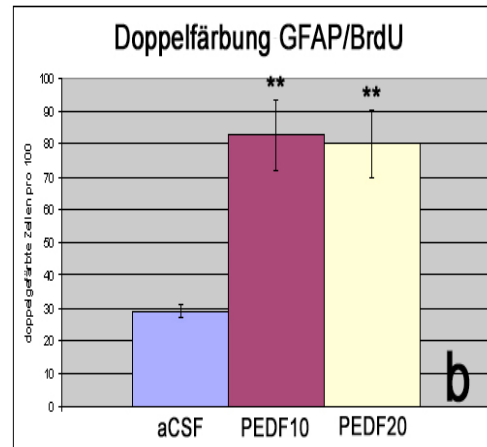
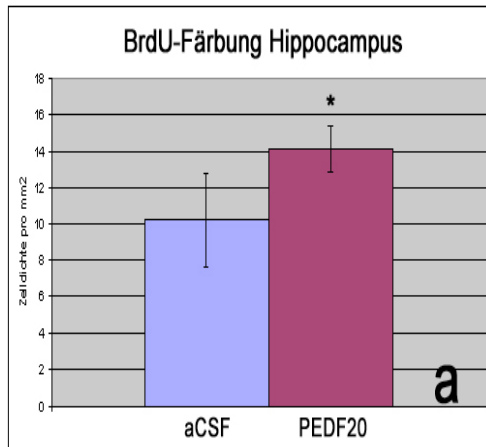
Differenzierungseffekt v.a. auf Neurone zum Tragen.

Die Betrachtung des parallelen Anstiegs der Differenzierung in den Gruppen PEDF10 und PEDF20 sowohl bei den GFAP-positiven als auch bei den TUJ1-positiven Zellen legt die Vermutung nahe, dass die unreifen Neurone auf der Basis der These von Alvarez-Buylla (Alvarez-Buylla et al., 2002) aus den astrozytenähnlichen Zellen entstanden sein könnten.

Ganz entscheidend bei der Betrachtung des Effekts von PEDF auf die Proliferation bzw. Differenzierung ist allerdings der Zeitpunkt der Beobachtung. Zunächst übt PEDF einen ziemlich einseitigen Effekt auf die Proliferation von neuronalen Vorläuferzellen aus, der sich allerdings bereits innerhalb der ersten Woche zu wandeln beginnt. Wie Ramirez-Castillejo *in vitro* feststellen konnte, führte PEDF nach 7 Tagen bereits zu proportional mehr TUJ1-positiven Zellen, also Neuronen (Ramirez-Castillejo et al., 2006). Wir konnten bestätigen, dass dieser Effekt auch *in vivo* besteht.

Abschließend kann man also zusammenfassen, dass sich PEDF einerseits positiv auf die Neurogenese im Sinne einer Selbsterneuerung von Stammzellen als auch auf die Differenzierung zu Gliazellen und Neuronen, auswirkt. Offen bleibt allerdings die Frage, inwieweit GFAP-positive Zellen den astrozytenähnlichen B-Zellen oder wirklich ausdifferenzierten Gliazellen entsprechen, wobei der parallele Anstieg der TUJ1-positiven Zellen darauf hinweist, dass es sich wohl eher um deren Vorläufer, die B-Zellen handeln dürfte.

Wir postulieren also, dass es sich bei PEDF auch in den Bereichen erhöhter adulter Neurogenese um einen potenten trophischen, d.h. einen die Differenzierung fördernden Faktor handelt und unterstreichen damit die Ergebnisse der Untersuchungen an Neuroblastomen (Crawford et al., 2001) und Prostatakarzinomen (Filleur et al., 2005), die hier bereits einen gleichsinnigen Effekt von PEDF nachgewiesen haben.

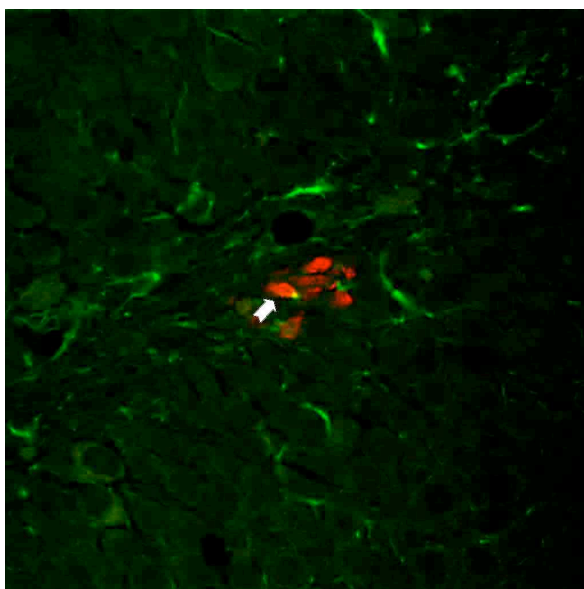


**Abb. 23:** Auswirkungen von PEDF im Hippocampus

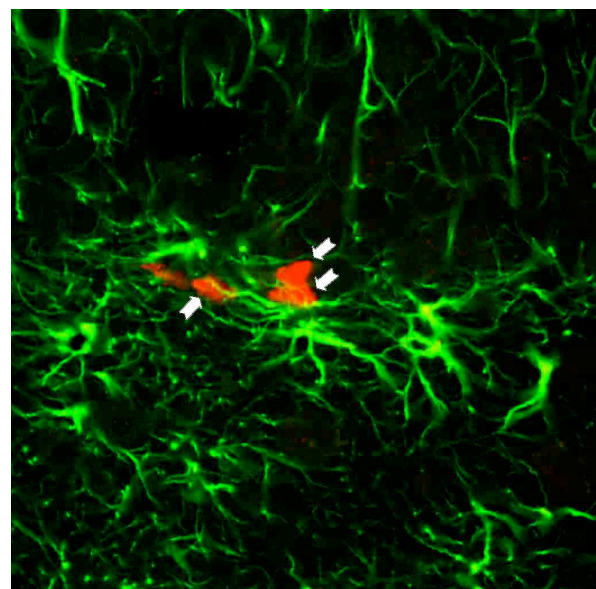
- (a) BrdU-positive Zellen im Hippocampus
- (b) Anteil der GFAP-positiven Zellen an den BrdU-positiven Zellen im Hippocampus
- (c) Anteil der TUJ-1-positiven Zellen an den BrdU-positiven Zellen im Hippocampus

\* = signifikanter Unterschied  $p < 0,05$  gegenüber der Kontrollgruppe

\*\* = hochsignifikanter Unterschied  $p < 0,01$  gegenüber der Kontrollgruppe



**a**

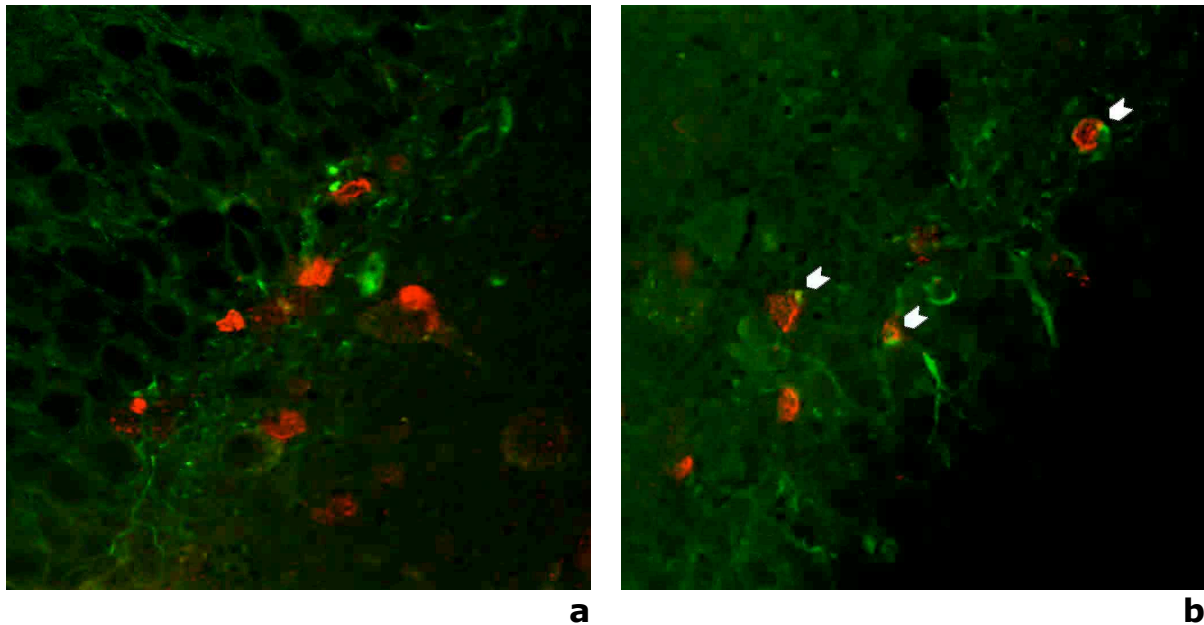


**b**

**Abb. 24:** Doppelfärbung BrdU/GFAP im Hippocampus

(a) Kontrollgruppe, Vergrößerung 40x (Ölimmersion); der Pfeil bezeichnet die einzige doppelgefärbte Zelle

(b) Gruppe PEDF20, Vergrößerung 40x (Ölimmersion); die Pfeile weisen auf die im Vergleich zur Kontrollgruppe größere Anzahl doppelgefärbter Zellen hin.



**Abb. 25:** Doppelfärbung BrdU/TUJ-1 im Hippocampus  
**(a)** Kontrollgruppe, Vergrößerung 40x (Ölimmersion); es ist keine zelluläre Kolokalisation der TUJ-1- und der BrdU-Färbung zu erkennen.  
**(b)** Gruppe PEDF20, Vergrößerung 40x (Ölimmersion); die Pfeile weisen auf die im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich größere Anzahl doppelgefärbter Zellen hin.

## 4. Auswirkungen des Wachstumsfaktors VEGF auf die Neurogenese und Differenzierung

### **a) in der Subventrikulärzone**

VEGF weist ein permeabilitätssteigerndes, angiogenes, neurogenes, tumorprogressionsförderndes und auch ein neuroprotektives Wirkspektrum auf.

Bei unseren Untersuchungen, die bekanntlich nur den Effekt von VEGF auf die Neurogenese bzw. Differenzierung innerhalb einer Woche zu ergründen versuchten, ergaben sich allerdings keinerlei Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sowohl die BrdU- als auch die DCX- Färbung konnten keine Tendenzen und signifikanten Unterschiede zwischen VEGF in der Konzentration 10µg/ml und den Kontrollen mit aCSF aufzeigen. Auch ein Effekt auf die Differenzierung der neuronalen Stammzellen, der mit Hilfe der Doppelfärbungen sichtbar gemacht werden sollte, konnte nicht ausgemacht werden. So war der Anteil der TUJ1-positiven bzw. der GFAP-positiven Zellen an den BrdU-positiven Zellen im Vergleich zwischen VEGF10 und aCSF ungefähr auf demselben Niveau.

Dahingehend konnten die von uns nun durchgeführten Experimente *in vivo* die vorangegangenen Ergebnisse *in vitro* bestätigen. Erstens wurden in der SVZ ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der absoluten Zellzahl zwischen der mit VEGF behandelten Gruppe und der Kontrolle festgestellt und zweitens konnte auch in der Doppelfärbung TUJ1/BrdU kein differenzierungsfördernder Effekt von VEGF im Vergleich der VEGF- und

der Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Hierdurch reihen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in die Reihe der kontroversen Diskussion über VEGF an sich und über die zugrunde liegenden zellulären Prozesse und Rezeptoren ein. Obwohl mittlerweile zwar eine Reihe von VEGF-Rezeptoren (VEGFR1/Flt-1; VEGFR2/Flk-1) und Co-Rezeptoren (Neuropilin-1; Neuropilin-2/ Chen et al., 1997; Soker et al., 1998) und deren Signaltransduktionswege hinsichtlich z.B. der Angiogenese erforscht sind, bleibt der genaue Mechanismus der neurogenetischen Wirkung unklar.

Kunlin Jin und seine Kollegen (Jin et al. 2002) stellten z.B. in einem ganz ähnlichen Versuchsaufbau – sie benutzten VEGF ebenfalls in einer Konzentration von 10µg/ml mit einem vergleichbaren Versuchsaufbau und betrachteten u.a. die kurzzeitigen Auswirkungen von VEGF nach den ersten sieben Tagen nach Beginn des Experiments - völlig andere Beobachtungen an. Sie registrierten einen deutlichen Anstieg BrdU-positiver Zellen und außerdem eine deutlich erhöhte Fraktion von doppelgefärbten Zellen mit BrdU und DCX, NeuN, GFAP bzw. vWF, was auf proliferative Effekte bei unreifen und reifen Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen hinweist. Diese Effekte schrieben sie einer direkten proliferativen Wirkung von VEGF und keiner verminderten Apoptoserate zu, was sie folgendermaßen begründeten: viele neu entstandene Neurone gehen kurz nach ihrer Mitose wieder zu Grunde, was auf einen Caspase-3 vermittelten Zelltod zurückzuführen ist. So markierten sie sowohl die VEGF affektierten Zellen wie auch die der Kontrollgruppe mit einem Antikörper gegen Caspase-3 und konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. In diesem Zusammenhang nehmen sie auch auf Palmers Modell der „Stammzellnische“ Bezug (Palmer et al., 2000) und schreiben VEGF eine wichtige Rolle als Bindeglied zwischen Vaskulogenese und Neurogenese zu. Viele Argumente deuten tatsächlich auf die Möglichkeit eines solchen Effekts hin. So wird z.B. der Rezeptor VEGFR2/Flk-1, der hauptsächlich für die neurogenetischen Effekte von VEGF verantwortlich gemacht wird, nicht nur von neuronalen Stammzellen, sondern auch von Neuronen und Gefäßendothelien exprimiert (Yang et al., 1996; Lennmyr et al., 1998; Jin et al., 2000). Darüberhinaus wäre ein solches Zusammenspiel auch pathophysiologisch sinnvoll, gerade im Zusammenhang mit ischämischen Schlaganfällen, bei denen bereits beobachtet wurde, dass VEGF sowohl die Neoangiogenese in der Penumbra (Cao et al., 2004) als auch die Eindämmung des infarzierten Areals (Hayashi et al. 1998) fördert und somit angiogen und neuroprotektiv wirkt. Eine wirkliche Erklärung der Unterschiede zu unseren Ergebnissen bleibt also aus.

Auf der anderen Seite gibt es allerdings viele Übereinstimmungen unserer Ergebnisse mit

denen anderer Publikationen:

Ein Experiment der Forschergruppe um Anne Schänzer der Universitätsklinik Regensburg (Schänzer et. al, 2004), das sowohl die Auswirkungen von VEGF auf die adulte Neurogenese *in vitro* als auch *in vivo* untersuchen sollte, ergab folgende Ergebnisse: nach der ersten Beobachtungsphase (eine Woche) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der BrdU-positiven Zellen gegenüber der Kontrollgruppe mit aCSF festgestellt werden. Ein deutlicher Effekt im Sinne eines 80%igen Anstiegs in der VEGF behandelten Gruppe konnte erst nach einem Beobachtungszeitraum von 4 Wochen festgestellt werden. Da die erste Phase die proliferative Aktivität von neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen reflektiert, mutmaßten Schänzer et al. im Gegensatz zu Jin et al., dass der Effekt von VEGF eher langfristig auf eine verminderte Apoptoserate zurückzuführen sei. Tatsächlich konnte mit Hilfe eines TUNEL-Essays bewiesen werden, dass bereits direkt nach der Infusion von VEGF signifikant weniger apoptotische Zellen zu sehen waren.

Bei diesem Experiment wurde VEGF in einer sehr geringen Konzentration (2,4 ng/d – entspricht bei einer Flussrate von 1 µl/h 0,1 ng/µl) intraventrikulär appliziert. Abgesehen von der indirekt stimulierenden Wirkung auf die Neurogenese konnten hier keine gleichzeitigen Auswirkungen auf die Angiogenese, Gefäßpermeabilität und Differenzierung von Astrozyten bzw. Endothelzellen festgestellt werden. So wird z.B. die Steigerung der Permeabilität erst bei VEGF-Konzentrationen von 2 ng/µl beobachtet (Proescholdt et al., 2002).

Neben der von Schänzer und Kollegen postulierten direkten Wirkweise von VEGF über den Rezeptor VEGFR2/Flk-1 wirkt VEGF indirekt neurogenetisch über eine NO vermittelte Sekretionssteigerung von BDNF (Louissaint et al., 2002; Chen et al., 2005) und trägt über FGF-2 zur gerichteten Migration von Neuroblasten (Zhang et al., 2003) bei.

### **b) im Hippocampus**

Im Gegensatz zur SVZ, in der keine wirklichen Effekte von VEGF innerhalb einer Woche festgestellt werden konnten, zeigte sich im Hippocampus zumindest ein robuster Trend zur vermehrten Anzahl BrdU-positiver und DCX-positiver Zellen. Auf der anderen Seite führte VEGF zu einem tendenziellen Absinken doppelgefärbter TUJ1/BrdU Zellen, wohingegen es zu keiner Veränderung bei der Doppelfärbung GFAP/BrdU im Vergleich zwischen VEGF und der Kontrollgruppe kam.

Ein Anstieg von BrdU-positiven Zellen im Hippocampus innerhalb desselben Beobachtungszeitraums wurde auch von Kunlin Jin (Jin et al. 2002) festgestellt. Im Vergleich dazu konnten Anne Schänzer und Kollegen einen solchen Effekt erst nach einem Zeitraum von vier Wochen ausmachen (Schänzer et. al, 2004).

Was die Differenzierung betrifft, so verhalten sich unsere Ergebnisse hier teilweise widersprüchlich: Im Sinne der Differenzierungseigenschaften von VEGF könnten wir unsere Beobachtungen der DCX-Färbung mit Jin und Kollegen in Einklang bringen, die ebenfalls eine vermehrte Doppelfärbung von DCX- und BrdU-positiven Zellen in der SGZ beobachteten, allerdings handelte es sich bei unserer Methode um eine DCX-Einfachfärbung. Schwierig wird es allerdings, wenn man versucht zu erklären, warum es zu einem Abfall TUJ1/BrdU doppelgefärbter Zellen kommt. Dieser Marker färbt schließlich neuronale Vorläufer, die in ihrer zeitlichen Entwicklung noch vor denen stehen, die durch DCX angefärbt werden. Eine mögliche Lösung dieses Problems kann wiederum die Überlegung sein, dass es sich bei den DCX Zellen nicht zwangsläufig nur um die Neuronen handelt, die nach der Implantation der Pumpen und damit nach Beginn des Experiments entstanden sind, sondern evtl. noch ein Teil der Neuronen positiv reagiert, die bereits vorher existierten. Der trophische Effekt von VEGF kann also nicht sicher beurteilt werden. Außerdem kann man aus der Zusammenschau mit den Ergebnissen der GFAP/BrdU-Doppelfärbung nicht von einem allgemein trophischen Effekt von VEGF innerhalb der ersten Woche ausgehen, da er keine Auswirkung auf Gliazellen zu haben scheint.

Ein Vergleich zu vorangegangenen *in vitro* Ergebnissen unserer eigenen Forschergruppe war in diesem Fall nicht möglich, da keine nähere Betrachtung des Hippocampus vorgenommen wurde.

## 5. VEGF und PEDF – gemeinsame Effekte auf Neurogenese und Differenzierung

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln ausführlich die Wirkung von den Einzelfaktoren VEGF und PEDF auf die adulte Neurogenese und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen dargestellt wurde soll nun als ein zentraler Punkt in der Fragestellung der vorliegenden Arbeit das Zusammenspiel zwischen den beiden Faktoren näher beleuchtet werden.

### **a) in der Subventrikulärzone**

Auf der Basis vorangegangener Experimente, die eine enge Wechselwirkung zwischen VEGF und PEDF in verschiedensten Geweben feststellen konnten, stellten wir die Hypothese auf, dass diese beiden Faktoren auch im Rahmen der adulten Neurogenese und der Differenzierung von neuronalen Stammzellen ein Verhältnis zweier Antagonisten aufweisen und somit einander gegensätzliche Effekte haben könnten. Um dies näher zu untersuchen

verglichen wir die Gruppen, in denen die Faktoren einzeln intrathekal appliziert wurden mit denen, bei welchen VEGF und PEDF in unterschiedlichen Konzentrationen *simultan* abgegeben wurden.

Folgende Beobachtungen konnten gemacht werden:

- VEGF10/PEDF10 führte im Vergleich zu VEGF10 zu keiner merklichen Vermehrung BrdU-positiver Zellen. Bei der doppelten Konzentration von PEDF (VEGF10/PEDF20) allerdings konnte bereits ein **signifikanter** Anstieg gegenüber VEGF10/PEDF10 verzeichnet werden ( $p=0,037$ ). Weiterhin zeigte auch PEDF20 eine deutliche Tendenz zu mehr BrdU-positiven Zellen als VEGF10/PEDF10 ( $p=0,055$ ).
- Auch in der DCX-Färbung nahm die Graphik einen ähnlichen Verlauf, was sich v.a. im tendenziellen Zuwachs von DCX-positiven Zellen zwischen der Gruppe PEDF20 und VEGF10/PEDF10 zeigte ( $p=0,078$ ).
- Während die Doppelfärbung TUJ-1/BrdU keine signifikanten Ergebnisse lieferte konnte in der Doppelfärbung GFAP/BrdU festgestellt werden, dass bereits VEGF10/PEDF10 eine deutliche Differenzierungstendenz im Vergleich zu VEGF10 aufwies ( $p=0,055$ ). Bei Dosissteigerung von PEDF (VEGF10/PEDF20) wurde der Unterschied **signifikant** ( $p=0,02$ ). Darüberhinaus führte PEDF allein appliziert (sowohl  $10\mu\text{g/ml}$  als auch  $20\mu\text{g/ml}$ ) zusätzlich zu einem **signifikanten** Anstieg gegenüber der Gruppe VEGF10/PEDF10 ( $p$  in beiden Fällen  $0,03$ ).

Diese Beobachtungen geben zu der Interpretation Anlass, dass VEGF und PEDF nicht nur gegensätzlich auf die Neurogenese und Differenzierung neuronaler Stammzellen in der SVZ wirken, sondern auch eine direkte Interaktion zwischen den beiden Faktoren besteht. Die Neurogenese- und Differenzierungsrate – zumindest im Bereich der Gliazellen – stieg jeweils gegenüber der Gruppe mit alleiniger Applikation von VEGF abhängig von der Dosis des mitverabreichten PEDF an, um nach Wegfall des hypothetischen Antagonisten VEGF noch weiter zuzunehmen. Die PEDF-Konzentration musste in diesem Fall nicht gesteigert, ja konnte teilweise sogar verringert werden, um trotzdem eine höhere Neurogenese und Differenzierungsrate zu erzielen.

## **b) im Hippocampus**

Interessanterweise konnte im Hippocampus hinsichtlich der Neurogenese (BrdU-Färbung) und der DCX-Färbung keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden.

Ganz anders sah das Ergebnis bei der Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen aus:

- während kein signifikanter Unterschied zwischen VEGF10 und VEGF10/PEDF10 festgestellt werden konnte, so führte eine Konzentrationssteigerung von PEDF

(VEGF10/PEDF20) zu einer **signifikant** höheren Rate an doppelgefärbten Zellen gegenüber VEGF10 ( $p=0,014$ ) und VEGF10/PEDF10 ( $p=0,007$ ). Darüberhinaus führten PEDF10 und PEDF20 zu einem weiteren **hochsignifikanten** bzw. **signifikanten** Anstieg im Vergleich zu VEGF10/PEDF20 ( $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ).

- Analog dazu verhielten sich die Ergebnisse der GFAP/BrdU-Doppelfärbung: VEGF10/PEDF10 zeigte bereits einen deutlichen Anstiegstrend im Vergleich zu VEGF10 ( $p=0,054$ ), der bei Konzentrationssteigerung von PEDF (VEGF10/PEDF20) **signifikant** wurde ( $p=0,037$ ). Ein weiterer, teils **hochsignifikanter** Effekt wurde durch die alleinige Gabe von PEDF in den Konzentrationen 10 und 20  $\mu\text{g/ml}$  gegenüber der Gruppe VEGF10/PEDF20 erzielt ( $p_1=0,004$ ;  $p_2=0,006$ ).

Zusammenfassend können also auch im Hippocampus ähnliche Beobachtungen wie in der SVZ gemacht werden. Da die BrdU-Färbung allerdings keine signifikanten Unterschiede lieferte, kann zumindest mit der momentan vorliegenden Datenmenge nicht auf eine Interaktion von VEGF und PEDF in Bezug auf die Neurogenese im Hippocampus geschlossen werden. Auf der anderen Seite konnten die Beobachtungen hinsichtlich der Differenzierung der Stammzellen in die neuronale Zelllinie, die durch die TUJ1/BrdU-Doppelfärbung im Hippocampus gemacht wurden, in der SVZ nicht bestätigt werden. Für diese Diskrepanzen bleiben hauptsächlich zwei unterschiedliche Erklärungsansätze offen:

Entweder es wurden zur Beobachtung dieser Effekte keine genügend hohen Stichprobenumfänge ausgewählt, oder es bestehen grundsätzliche Unterschiede zwischen SVZ und Hippocampus, die für die Abweichungen verantwortlich gemacht werden können. Auf diese Möglichkeit wird in einem der folgenden Abschnitte noch näher eingegangen werden.

Zunächst kann man allerdings festhalten, dass ein Agonismus-Antagonismus-Verhältnis zwischen VEGF und PEDF in Bezug auf die adulte Neurogenese und die Differenzierung eindeutig belegt sind. Diese Ergebnisse repräsentieren Daten, die vorher noch niemand erhoben hat. Eine Interaktion zwischen VEGF und PEDF, ja sogar ein ausgeklügeltes Gleichgewicht der beiden Faktoren wurde allerdings in vielen anderen Bereichen des Organismus mittlerweile sicher belegt und kann auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden, die sich grob in (1) Gegenseitige Beeinflussung der Genexpression, (2) Interaktionen mit anderen Molekülen und (3) Rezeptorinteraktionen einteilen lassen:

1. Im Zusammenhang der durch VEGF hervorgerufenen Angiogenese konnte als ein wichtiger Regulator der Genexpression der nukleäre Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) ausgemacht werden, der sich sowohl auf das Überleben wie auch die



Apoptose einer Zelle auswirken kann (Hernandez et al. 2001). NFAT übt über verschiedenste Mechanismen Einfluss auf die Zelle aus, indem er die Expression bestimmter Zytokine (IL-2, IL-4, GM-CSF) induziert, zur Induktion von Zyklinen und Down-Regulation von negativen Zellzyklusregulatoren wie p21 und p27 führt. Über c-FLIP kann NFAT auch die Angiogenese beeinflussen. Diese Mechanismen werden von PEDF über sogenannte JNK-Kinasen massiv reduziert, die ihrerseits zu einem nukleären Export und einer zytoplasmatischen Retention von NFAT führen (Zaichuk et al, 2004).

In der onkologischen Forschung konnte außerdem festgestellt werden, dass PEDF die Genexpression (mRNA) und Proteinbildung von VEGF in MG63-Osteosarkomzellen direkt reduzierte (Takenaka et al, 2005).

2. Neben einer direkten Interaktion auf transkriptionalem und translationalem Level beeinflussen sich VEGF und PEDF auch über weitere intra- bzw. extrazelluläre Strukturen.

Wichtig für den angiogenetischen Effekt von VEGF ist die Verbindung von neu entstandenen Endothelzellen mit dem extrazellulären Kollagen-1. Diese Verbindung wird durch  $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, welches durch VEGF hochreguliert wird, erleichtert. PEDF wiederum bindet, wie weiter oben bereits erläutert, an Kollagen-1 und vermindert somit die Anbindungsfähigkeit neu entstandener Endothelzellen (Hosomichi et al, 2005).

Zudem konnte nachgewiesen werden, dass PEDF zu einer Inhibierung NADPH-abhängiger freier Sauerstoffradikale führte, die ihrerseits eine vermehrte VEGF-Genexpression bewirken (Yamagishi et al., 2006). Im Gegensatz zu VEGF, deren mRNA-Menge in reifen Zellen des retinalen Pigmentepithels unter pathologischen Mengen von  $H_2O_2$  nicht beeinflusst wird, nimmt die mRNA von PEDF drastisch ab, wodurch das labile Gleichgewicht der beiden Faktoren in der Retina erheblich gestört wird. Dies führt dazu, dass PEDF die angiogenetischen Eigenschaften von VEGF nicht mehr dämpfen kann und somit pathologische choroidale Gefäße durch das Retinale Pigmentepithel in die retinale Gefäßarchitektur einsprossen können (Ohno-Matsui et al., 2001).

Auf der anderen Seite kann auch VEGF die Menge an PEDF negativ beeinflussen, wobei es die Expression zytoplasmatischer Matrix-Metalloproteinasen vom Typ 2 und Typ 9 (MMP-2, MMP-9) induziert, die daraufhin zu einer posttranslationalen Degeneration von PEDF führen (Notari et al., 2005).

3. Besondere Beachtung findet abschließend auch die Interaktion von VEGF und PEDF über unterschiedliche Rezeptoren, da im Gegensatz zu VEGF noch kein gesicherter PEDF-Rezeptor ausgemacht werden konnte. Somit bleibt die Möglichkeit bestehen, dass die Effekte von PEDF teilweise sogar über dieselben Rezeptoren vermittelt werden könnten.

Gerade im retinalen Pigmentepithel, dem ersten „Fundort“ von PEDF, ist das Gleichgewicht von VEGF und PEDF mittlerweile recht gut untersucht. In diesem Zusammenhang weiß man, dass sich die beiden Faktoren nicht nur negativ beeinflussen, sondern beide versuchen, sich gegenseitig im Gleichgewicht zu halten. So führt VEGF über einen autokrinen Mechanismus an VEGF-R1-Rezeptoren zu einer vermehrten PEDF mRNA-Menge und Proteinexpression. Dieser Effekt konnte über einen spezifischen Antikörper gegen VEGF-R1 völlig blockiert werden, wohingegen die Blockierung des VEGF-R2-Rezeptors zu keinem Effekt führte (Ohno-Matsui et al., 2003).

Bereits Zhang et al. konnten feststellen, dass im Rattenmodell der diabetischen Retinopathie und der Sauerstoff induzierten Retinopathie VEGF und VEGF-R2 massiv hochreguliert wurden, wobei die Menge an PEDF abnahm. Durch eine intravitreale Injektion von PEDF konnte allerdings eine signifikante Reduktion dieser Effekte herbeigeführt werden (Zhang et al., 2005). Die molekularen Mechanismen hinter diesem Phänomen konnten zunächst von ihm nicht geklärt werden.

Obwohl mittlerweile gesichert ist, dass der angiogenetische Effekt von VEGF über den VEGF-R2-Rezeptor vermittelt wird, scheint PEDF über VEGF-R1 ebenfalls Einfluss auf diesen Vorgang zu nehmen. Über die Induktion der  $\gamma$ -Sekretase führt PEDF zu einer Spaltung des Rezeptors in der Nähe seiner Transmembrandomäne und zur Abspaltung eines C-terminalen Fragments ins Zytosol. Dieses Fragment verhinderte die Phosphorylierung des Schwesterrezeptors VEGF-R2, welche wiederum entscheidend ist für die Signaltransduktion über diesen Rezeptor (Cai et al., 2005). Dieser Effekt stellt damit sozusagen eine Art Brücke zwischen expressionsbedingten und rezeptorbedingten Interaktionen zwischen VEGF und PEDF dar und ist auch in der Lage, die Beobachtungen von Zhang et al. zu erklären.

## 6. Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse für die Neurowissenschaften

Die Forschung über den Ersatz von Nervenzellen ist nicht nur von rein akademischem Interesse. Neurodegenerative Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer und der Morbus Parkinson haben eine enorme sozioökonomische Bedeutung und ihre Inzidenz steigt mit höherem Lebensalter.

Obwohl es, wie seit einem guten Jahrzehnt bekannt, während des gesamten Lebens zur konstanten Neubildung von Nervenzellen in bestimmten Bereichen des menschlichen Gehirns kommt, kann dieser Prozess interessanterweise das Fortschreiten dieser Erkrankungen nicht merklich verlangsamen. Deshalb stellt sich die Frage, welche Prozesse notwendig sind, um den Verlust vorhandener Nervenzellen wieder auszugleichen:

1. Ersatz der untergegangenen Nervenzellen
2. Steuerung der Migration von Progenitorzellen an den Ort der Läsion
3. Steuerung der Differenzierung zu funktionalen Neuronen und deren Integration in den Nervenzellverband
4. Neuroprotektion der funktionierenden Neuronen

Es konnte bisher nur gezeigt werden, dass diese Prozesse durchaus von außen beeinflusst werden können ohne jedoch die Interaktion zwischen Neurodegeneration, Neurogenese, neuronale Differenzierung und Neuroprotektion besser zu verstehen: so war es z.B. möglich neuronale Vorläuferzellen dazu zu bringen, sich im Neokortex von Säugetieren neu zu formieren und dort auch wieder adäquate kortiko-thalamische Verbindungen zu knüpfen (Magavi et al., 2000). Auch bei einem künstlich herbeigeführten Schlaganfall bei Ratten konnten anderenorts entstandene neuronale Vorläuferzellen die untergegangenen ersetzen, indem sie in das Striatum migrierten und sich dort zu striatalen Neuronen differenzierten (Arvidsson et al., 2002). Bei beiden Beispielen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, dass sich die Neurone auch tatsächlich in den vorhandenen Verband von Nervenzellen integrieren konnten. Was das betrifft, so konnte allerdings in einem Versuch, neuronale Vorläuferzellen mit Wachstumsfaktoren zu stimulieren und so eine durch Ischämie verursachte Schädigung des Hippocampus zu therapieren, tatsächlich eine Besserung der neurologischen Defizite bewirkt werden (Nakatomi et al., 2002). Es scheint also möglich zu sein, durch die Applikation von Wachstumsfaktoren die neuroregenerativen Prozesse positiv zu beeinflussen (Kuhn et al., 2001; Kempermann et al., 2002). Einer der in dieser Arbeit untersuchten Wachstumsfaktoren, PEDF, ist wohl in diesem Zusammenhang von besonderer

Bedeutung. Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt PEDF erstens zu einem deutlichen Anstieg der Neurogeneserate und liefert deshalb vermehrt neue neuronale Vorläuferzellen (positiv proliferativer Effekt). Als zweiter Punkt wird auch die Migration dieser Vorläuferzellen von PEDF positiv beeinflusst, was an einer gesteigerten Rate von DCX-positiven Zellen in der SVZ erkennbar war. DCX diente in diesem Fall als spezifischer Marker für migrierende Neuroblasten. Gerade im Zusammenhang mit den bereits genannten neurodegenerativen Erkrankungen konnte für PEDF sowohl ein differenzierungsfördernder als auch ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden: Patienten mit der Parkinson'schen Krankheit, bei der es durch den Verlust von Neuronen u.a. in der Substantia nigra zur Dopamindefizienz kommt, profitieren vermutlich von einer Implantation retinaler Pigmentepithelzellen in die Basalganglien, da aus in diesen Zellen vorkommenden Dopamin-Vorstufen kontinuierlich Dopamin nachgebildet werden kann. In einem Versuch wurde das Pigmentepithel *in vitro* mesenzephalen dopaminergen und striatalen enkephalinerger Neuronen aus der Ratte zugesetzt, was auch einen lebensverlängernden Effekt auf diese Zellen hatte und einen vermehrten Auswuchs ihrer Neuriten bewirkte. Bei der Suche nach den hierfür verantwortlichen Faktoren konnte nur einer nachgewiesen werden: PEDF (McKay et al., 2006). Dahingehend kann man die differenzierungsfördernden Effekte, die innerhalb dieser Arbeit erwiesen wurden, als bestätigt sehen. Auch beim Morbus Alzheimer wird PEDF vermehrt exprimiert, was zu der Vermutung führt, dass es günstige Auswirkungen auf den neuronalen Zelltod haben könnte, der durch die Ablagerungen der senilen Plaques bestehend aus Amyloid  $\beta$ - und Tau-Protein hervorgerufen wird (Yamagishi et al., 2004).

Natürlich bleiben in diesem Zusammenhang noch viele Fragen offen und noch längst nicht alle könne durch die bisher gefundenen Effekte unterschiedlicher Wachstumsfaktoren erklärt werden. Warum kommt es z.B. trotz der physiologisch vorkommenden Faktoren nicht zu einer „Selbstheilung“ der neurodegenerativen Erkrankungen? Liegt es an einer zu geringen Konzentration oder spielen noch andere bisher nicht entdeckte Faktoren eine Rolle?

In jedem Fall ist das Verständnis der Regulation und Interaktion einzelner Wachstumsfaktoren wie in diesem Fall VEGF und PEDF bei der adulten Neurogenese von entscheidender Bedeutung um eine klinische Anwendung zu ermöglichen.

## F. Zusammenfassung

Zur Beantwortung der allgemeinen und speziellen Fragestellung dieser Arbeit können abschließend folgende Antworten gegeben werden:

1. Anhand der vorliegenden Ergebnisse führte PEDF innerhalb von sieben Tagen bereits zu einer deutlich gesteigerten absoluten Zahl an neu entstandenen BrdU-positiven Zellen in der SVZ und im Hippocampus (verglichen mit der Kontrollgruppe) und ist damit ein potenter neurogenetischer Faktor.
2. PEDF führte in der SVZ zu einer häufigeren Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen hin zu reiferen migrationsfähigen Neuronen, welche mit Hilfe von Antikörpern gegen DCX detektiert wurden. Im Hippocampus konnte diese Beobachtung auf für unreifere Neuronen, die TUJ-1 positiv waren, übertragen werden. Darüberhinaus zeigte sich sowohl in der SVZ als auch im Hippocampus ein differenzierungsfördernder Effekt hinsichtlich der GFAP-positiven Neuronen. Vorher beobachtete ähnliche Effekte in Tumorgewebe wie bei Neuroblastomen (Crawford et al., 2001) und Prostatakarzinomen (Filleur et al., 2005) konnten somit bestätigt werden.
3. Ein gegensätzliches Verhalten und ein direkter Antagonismus von VEGF und PEDF konnte in vielerlei Hinsicht bestätigt werden:  
Bei der GFAP/BrdU-Doppelfärbung in der SVZ wurden signifikant mehr doppelgefärbte Zellen bei der alleinigen Gabe von PEDF beobachtet. In Kombination mit VEGF kam es dann allerdings nicht zu einer signifikanten Steigerung der doppelgefärbten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe.  
Im Hippocampus führten zwar auch VEGF/PEDF simultan zu einem signifikanten Anstieg, allerdings war der Anstieg bei alleiniger Gabe von PEDF deutlich höher als bei VEGF/PEDF.
4. Grundsätzlich konnten sowohl in der SVZ als auch im Hippocampus ähnliche Ergebnisse erzielt werden, was einen Hinweis darauf liefert, dass es sich bei den festgestellten Eigenschaften und Interaktionen der beiden Wachstumsfaktoren um allgemeingültige Tatsachen handelt.
5. Soweit vergleichbar konnten die vorher gewonnen Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich der Neurogenese- und Differenzierungseigenschaften von PEDF und seiner Interaktion mit VEGF bestätigt werden.

## G. Literaturverzeichnis

- Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP.  
Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor.  
*J Biol Chem.* 1999 Oct 29;274(44):31605-12.
- Altman J, Das GD.  
Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.  
*J Comp Neurol* 1965, 124(3): 319-335
- Altman J.  
Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb.  
*J Comp Neurol.* 1969 Dec;137(4):433-57
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM.  
Neurogenesis in adult subventricular zone.  
*J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):629-34. Review
- Alvarez-Buylla A, Ling CY, Yu WS.  
Contribution of neurons born during embryonic, juvenile, and adult life to the brain of adult canaries: regional specificity and delayed birth of neurons in the song-control nuclei.  
*J Comp Neurol.* 1994 Sep 8;347(2):233-48
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O  
Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke  
*Nat Med.* 2002 Sep;8(9):963-70. Epub 2002 Aug 5
- Banasr M, Hery M, Brezun JM, Daszuta A.  
Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus.  
*Eur J Neurosci.* 2001 Nov;14(9):1417-24.
- Becerra SP, Sagasti A, Spinella P, Notario V.  
Pigment epithelium-derived factor behaves like a noninhibitory serpin. Neurotrophic activity does not require the serpin reactive loop.  
*J Biol Chem.* 1995 Oct 27;270(43):25992-9.
- Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncel RW.  
Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons.  
*J Neurosci.* 2002 Nov 1;22(21):9378-86.
- Bonfanti L, Theodosis DT.  
Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule by proliferating cells in the subependymal layer of the adult rat. In its rostral extension and in the olfactory bulb.  
*Neuroscience.* 1994 Sep;62(1):291-305.
- Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W.  
Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation.  
*Development.* 1992 Feb;114(2):521-32.
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG.  
Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis.  
*J Comp Neurol.* 2003 Dec 1;467(1):1-10.
- Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M.  
Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1.  
*J Biol Chem.* 2006 Feb 10;281(6):3604-13. Epub 2005 Dec 8.
- Cao, W., Tombran-Tionk, J., Chen, W., Mrazek, D., Elias, R., McGinnis, J.F., 1999.  
Pigment epithelium-derived factor protect culture retinal neurons against hydrogen peroxide- induced cell death. *J. Neuroscience. Res.* 57, 789-800
- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ.  
VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory.  
*Nat Genet.* 2004 Aug;36(8):827-35. Epub 2004 Jul 18.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E.  
Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat.  
*Neuroscience.* 1993 Sep;56(2):337-44.

- Cameron HA, McKay RD.  
Restoring production of hippocampal neurons in old age.  
*Nat Neurosci.* 1999 Oct;2(10):894-7.
- Chen YS, Hackett SF, Schoenfeld CL, Vinore MA, Vinore SA, Campochiaro PA.  
Localisation of vascular endothelial growth factor and its receptors to cells of vascular and avascular epiretinal membranes.  
*Br J Ophthalmol.* 1997 Oct;81(10):919-26.
- Chen J, Zacharek A, Zhang C, Jiang H, Li Y, Roberts C, Lu M, Kapke A, Chopp M.  
Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice.  
*J Neurosci.* 2005 Mar 2;25(9):2366-75.
- Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J.  
Generalized potential of adult neural stem cells.  
*Science.* 2000 Jun 2;288(5471):1660-3.
- Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG.  
Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain.  
*Brain Res Dev Brain Res.* 2002 Mar 31;134(1-2):13-21.
- Crawford SE, Stellmach V, Ranalli M, Huang X, Huang L, Volpert O, De Vries GH, Abramson LP, Bouck N.  
Pigment epithelium-derived factor (PEDF) in neuroblastoma: a multifunctional mediator of Schwann cell antitumor activity.  
*J Cell Sci.* 2001 Dec;114(Pt 24):4421-8.
- des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J.  
A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome.  
*Cell.* 1992; 92:51-61.
- Duch M, Paludan K, Jorgensen P, Pedersen FS.  
Lack of correlation between basal expression levels and susceptibility to transcriptional shutdown among single-gene murine leukemia virus vector proviruses.  
*J Virol.* 1994 Sep;68(9):5596-601.
- Doetsch F.  
A niche for adult stem cells  
*Curr. Opin., Genet. Dev.* 2003; 13, 543-550
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.  
Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain.  
*J Neurosci.* 1997 Jul 1;17(13):5046-61.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.  
Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain.  
*Cell.* 1999 Jun 11;97(6):703-16.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A.  
Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Sep 28;96(20):11619-24.
- Dolbeare F.  
Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis.  
*Histochem J.* 1995 Dec;27(12):923-64.
- Dolbeare F.  
Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part III. Proliferation in normal, injured and diseased tissue, growth factors, differentiation, DNA replication sites and in situ hybridization.  
*Histochem J.* 1996 Aug;28(8):531-75.
- Duffau H.  
Brain plasticity: from pathophysiological mechanisms to therapeutic applications.  
*J Clin Neurosci.* 2006 Nov;13(9):885-97. Epub 2006 Oct 17. Review.
- Dunnett SB, Bjorklund A.  
Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease.  
*Nature.* 1999 Jun 24;399(6738 Suppl):A32-9. Review.
- Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD.  
VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis.  
*Eur J Neurosci.* 2003 Nov;18(10):2803-12.

- Feigl B.  
Age-related maculopathy in the light of ischaemia.  
*Clin Exp Optom.* 2007 Jul;90(4):263-71. Review.
- Ferrara N, Henzel WJ  
Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Jun 15;161(2):851-8.
- Filleur S, Volz K, Nelius T, Mirochnik Y, Huang H, Zaichuk TA, Aymerich MS, Becerra SP, Yap R, Veliceasa D, Shroff EH, Volpert OV.  
Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer.  
*Cancer Res.* 2005 Jun 15;65(12):5144-52.
- Gage FH, Kempermann G, Palmer TD, Peterson DA, Ray J.  
Multipotent progenitor cells in the adult dentate gyrus.  
*J Neurobiol.* 1998 Aug;36(2):249-66. Review.
- Glaser JR, Glaser EM  
Stereology, morphometry, and mapping: the whole is greater than the sum of its parts  
*Journal of Chemical Neuroanatomy* 20 (2000) 115–126
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA.  
Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signalling protein.  
*Cell*, 1998; 92:63–72.
- Goldman SA, Nottebohm F.  
Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Apr;80(8):2390-4.
- Gould E.  
How widespread is adult neurogenesis in mammals?  
*Nat Rev Neurosci.* 2007 Jun;8(6):481-8. Review.
- Greenberg DA, Jin K.  
From angiogenesis to neuropathology.  
*Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):954-9. Review.
- Hayashi T, Abe K, Itoyama Y.  
Reduction of ischemic damage by application of vascular endothelial growth factor in rat brain after transient ischemia.  
*J Cereb Blood Flow Metab.* 1998 Aug;18(8):887-95.
- Hernandez GL, Volpert OV, Iniguez MA, Lorenzo E, Martinez-Martinez S, Grau R, Fresno M, Redondo JM.  
Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2.  
*J Exp Med.* 2001 Mar 5;193(5):607-20.
- Hitoshi S, Alexson T, Tropepe V, Donoviel D, Elia AJ, Nye JS, Conlon RA, Mak TW, Bernstein A, van der Kooy D.  
Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells.  
*Genes Dev.* 2002 Apr 1;16(7):846-58.
- Hjelmeland, L.M., Cristofalo, V.J., Funk, W., Rakoczy, E., Katz, M.L., 1999  
Senescence of the retinal pigment epithelium.  
*Mol. Vis.* 5, 33
- Hosomichi J, Yasui N, Koide T, Soma K, Morita I.  
Involvement of the collagen I-binding motif in the anti-angiogenic activity of pigment epithelium-derived factor.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 30;335(3):756-61.
- Houenou LJ, D'Costa AP, Li L, Turgeon VL, Enyadike C, Alberdi E, Becerra SP.  
Pigment epithelium-derived factor promotes the survival and differentiation of developing spinal motor neurons.  
*J Comp Neurol.* 1999 Sep 27;412(3):506-14.
- Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K.  
Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death.  
*J Cell Physiol.* 2004 Aug 12



- Johansson CB.  
Mechanism of stem cells in the central nervous system.  
*J Cell Physiol.* 2003 Sep;196(3):409-18. Review.
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA.  
Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11946-50. Epub 2002 Aug 14.
- Jin KL, Mao XO, Greenberg DA.  
Vascular endothelial growth factor rescues HN33 neural cells from death induced by serum withdrawal.  
*J Mol Neurosci.* 2000 Jun;14(3):197-203.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH.  
Genetic influence on neurogenesis in the dentate gyrus of adult mice.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Sep 16;94(19):10409-14.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH.  
Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment.  
*Ann Neurol.* 2002 Aug;52(2):135-43.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH.  
Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation.  
*J Neurosci.* 1996 Mar 15;16(6):2027-33.
- Kuhn HG, Palmer TD, Fuchs E  
Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage.  
*Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2001 Aug;251(4):152-8.
- Lee MK, Tuttle JB, Rebhun LI, Cleveland DW, Frankfurter A.  
The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis.  
*Cell Motil Cytoskeleton.* 1990;17(2):118-32.
- Lennmyr F, Ata KA, Funa K, Olsson Y, Terent A.  
Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat.  
*J Neuropathol Exp Neurol.* 1998 Sep;57(9):874-82.
- Lois C, Alvarez-Buylla A.  
Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Mar 1;90(5):2074-7.
- Lois C, Alvarez-Buylla A.  
Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.  
*Science.* 1994 May 20;264(5162):1145-8.
- Louissaint A Jr, Rao S, Leventhal C, Goldman SA.  
Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain.  
*Neuron.* 2002 Jun 13;34(6):945-60.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD  
Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice  
*Nature.* 2000 Jun 22;405(6789):951-5
- Maik-Rachline G, Shaltiel S, Seger R.  
Extracellular phosphorylation converts pigment epithelium- derived factor from a neurotrophic to an antiangiogenic factor.  
*Blood.* 2004 Sep 16
- McKay BS, Goodman B, Falk T, Sherman SJ  
Retinal pigment epithelial cell transplantation could provide trophic support in Parkinson's disease: results from an in vitro model system.  
*Exp Neurol.* 2006 Sep;201(1):234-43. Epub 2006 Jun 9.
- Mokry J, Subrtova D, Nemecek S.  
Cultivation of neural EGF-responsive precursor cells.  
*Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove.* 1995;38(4):167-74.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M  
Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors  
*Cell.* 2002 Aug 23;110(4):429-41
- Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, Ide C, Honda Y.  
Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000 Dec;41(13):4268-74.

- Notari L, Miller A, Martinez A, Amaral J, Ju M, Robinson G, Smith LE, Becerra SP.  
Pigment epithelium-derived factor is a substrate for matrix metalloproteinase type 2 and type 9: implications for downregulation in hypoxia.  
*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005 Aug;46(8):2736-47.
- Ohno-Matsui K, Morita I, Tombran-Tink J, Mrazek D, Onodera M, Uetama T, Hayano M, Murota SI, Mochizuki M.  
Novel mechanism for age-related macular degeneration: an equilibrium shift between the angiogenesis factors VEGF and PEDF.  
*J Cell Physiol.* 2001 Dec;189(3):323-33.
- Ohno-Matsui K, Yoshida T, Uetama T, Mochizuki M, Morita I.  
Vascular endothelial growth factor upregulates pigment epithelium-derived factor expression via VEGFR-1 in human retinal pigment epithelial cells.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Apr 11;303(3):962-7
- Palmer TD, Takahashi J, Gage FH.  
The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells.  
*Mol Cell Neurosci.* 1997;8(6):389-
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis.  
*J Comp Neurol.* 2000 Oct 2;425(4):479-94.
- Parent JM, Tada E, Fike JR, Lowenstein DH.  
Inhibition of dentate granule cell neurogenesis with brain irradiation does not prevent seizure-induced mossy fiber synaptic reorganization in the rat.  
*J Neurosci.* 1999 Jun 1;19(11):4508-19.
- Potten CS, Loeffler M.  
Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt.  
*Development.* 1990 Dec;110(4):1001-20. Review.
- Pumiglia K, Temple S.  
PEDF: bridging neurovascular interactions in the stem cell niche.  
*Nat Neurosci.* 2006 Mar;9(3):299-300.
- Rakic P.  
Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis.  
*J Neurosci.* 2002 Feb 1;22(3):614-8.
- Ramirez-Castillejo C, Sanchez-Sanchez F, Andreu-Agullo C, Ferron SR, Aroca-Aguilar JD, Sanchez P, Mira H, Escibano J, Farinas I.  
Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal.  
*Nat Neurosci.* 2006 Mar;9(3):331-9. Epub 2006 Feb 19.
- Ramón y Cajal, S.  
*Degeneration and Regeneration of the Nervous System.* London 1928
- Reynolds BA, Weiss S.  
Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.  
*Science.* 1992 Mar 27;255(5052):1707-10.
- Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A.  
Embryonic (PSA) N-CAM reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice.  
*J Comp Neurol.* 1995 Jan 2;351(1):51-61.
- Schänzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG.  
Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor.  
*Brain Pathol.* 2004 Jul;14(3):237-48.
- Schlachetzki F, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM  
Gene therapy of the brain, The trans-vascular approach  
*Neurology* 2004; 62:1275–1281
- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF.  
Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.  
*Science.* 1983 Feb 25;219(4587):983-5
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A.  
Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus  
*J Neurosci.* 2001 Sep 15;21(18):7153-60.
- Shibuya M.  
Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis.  
*Angiogenesis.* 2006;9(4):225-30; discussion 231. Epub 2006 Nov 16. Review.

- Shibuya M.  
Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E.  
*Endothelium*. 2006 Mar-Apr;13(2):63-9. Review.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M.  
Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor.  
*Cell*. 1998 Mar 20;92(6):735-45.
- Spranger, J., Osterhoff, M., Reimann, M., Mohlig, M., Ristow, M., Francis, M.K., Cristofalo, V., Hammes, H.P., Smith, G., Boulton, M., Pfeiffer, A.F.  
Loss of antiangiogenic pigment epithelium-derived factor in patients with angiogenic eye disease.  
*Diabetes* 2001 50, 2641-2645
- Stellmach, V., Crawford, S. E., Zhou, W. and Bouck, N., 2001.  
Prevention of ischemia induced retinopathy by the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2593- 2597.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA.  
VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia.  
*J Clin Invest*. 2003 Jun;111(12):1843-51
- Takenaka K, Yamagishi S, Jinnouchi Y, Nakamura K, Matsui T, Imaizumi T.  
Pigment epithelium-derived factor (PEDF)-induced apoptosis and inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in MG63 human osteosarcoma cells.  
*Life Sci*. 2005 Nov 4;77(25):3231-41. Epub 2005 Jun 27.
- Takahashi T., Nowakowski, R.S., Caviness, V.S., Jr., 1992  
BrdU as an S-Phase marker for quantitative studies of cytokinetic behaviour in the murine cerebral ventricular zone.  
*J. Neurocytol* 21, 185-197
- Takita H, Yoneya S, Gehlbach PL, Duh EJ, Wei LL, Mori K.  
Retinal neuroprotection against ischemic injury mediated by intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Oct;44(10):4497-504.
- Taniwaki T, Hirashima N, Becerra SP, Chader GJ, Etcheberrigaray R, Schwartz JP.  
Pigment epithelium-derived factor protects cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced neurotoxicity.  
*J Neurochem*. 1997 Jan;68(1):26-32.
- Tanapat P, Galea LA, Gould E.  
Stress inhibits the proliferation of granule cell precursors in the developing dentate gyrus.  
*Int J Dev Neurosci*. 1998 Jun-Jul;16(3-4):235-9.
- Taupin P.  
Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical interest.  
*Med Sci Monit*. 2005 Jul;11(7):RA247-252. Epub 2005 Jun 29. Review.
- Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, Chader GJ.  
Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin.  
*Mol Vis*. 1996 Nov 4;2:11.
- Tombran-Tink, J., Johnson, L.V., 1989.  
Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells.  
*Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 30, 1700-1707
- Trepel M.  
Entwicklungsgeschichte des Nervensystems; Neuroanatomie Struktur und Funktion, München <sup>3</sup> 2004, S.13-20
- Volpert, O.V., Zaichuk, T., Zhou, W., Reiher, F., Ferguson, T.A., Stuart, P.M., Amin, M., Bouck, N.P.,  
Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor.  
*Nat. Med* 2002. 8, 349-357
- Ward JM, Henneman JR, Osipova GYu, Anisimov VN.  
Persistence of 5-bromo-2'-deoxyuridine in tissues of rats after exposure in early life.  
*Toxicology*. 1991;70(3):345-52.
- Yamagishi S, Inagaki Y, Takeuchi M, Sasaki N.  
Is pigment epithelium-derived factor level in cerebrospinal fluid a promising biomarker for early diagnosis of Alzheimer's disease?  
*Med Hypotheses*. 2004;63(1):115-7.

- Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Inagaki Y, Takenaka K, Jinnouchi Y, Yoshida Y, Matsuura T, Narama I, Motomiya Y, Takeuchi M, Inoue H, Yoshimura A, Bucala R, Imaizumi T.  
Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression.  
*J Biol Chem.* 2006 Jul 21;281(29):20213-20. Epub 2006 May 17
- Yang K, Cepko CL.  
Flk-1, a receptor for vascular endothelial growth factor (VEGF), is expressed by retinal progenitor cells.  
*J Neurosci.* 1996 Oct 1;16(19):6089-99.
- Zaichuk TA, Shroff EH, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert OV.  
Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition.  
*J Exp Med.* 2004 Jun 7;199(11):1513-22.
- Zhang SX, Ma JX.  
Ocular neovascularization: Implication of endogenous angiogenic inhibitors and potential therapy.  
*Prog Retin Eye Res.* 2007 Jan;26(1):1-37. Epub 2006 Oct 30. Review .
- Zhang H, Vutskits L, Pepper MS, Kiss JZ.  
VEGF is a chemoattractant for FGF-2-stimulated neural progenitors.  
*J Cell Biol.* 2003 Dec 22;163(6):1375-84.
- Zhang SX, Wang JJ, Gao G, Shao C, Mott R, Ma JX.  
Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous anti-inflammatory factor.  
*FASEB J.* 2006 Feb;20(2):323-5. Epub 2005 Dec 20.

## H. Anhang

### Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

aCSF	artificial Cerebrospinal Fluid
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BF	Bright Field
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BrdU	Bromodeoxiuridin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CB	Cerebellum
CC	Corpus Callosum SVZ
CK2	Creatinkinase 2
EGF	Epidermal Growth Factor
GFAP	Glial Fibrillar Acidic Protein
HVZ	Higher Vocal Zone
LV	lateraler Ventrikel
NC	Neocortex
NO	Stickstoffmonoxid
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OB	Olfactory Bulb (Bulbus olfactorius)
PAI	Plasminogen Aktivator Inhibitor
PEDF	Pigment Epithelium Derived Factor
PKA	Proteinkinase A
RMS	Rostral Migratory Stream
SGS = SGL	Subgranulärschicht bzw. Subgranular Layer
SVZ	Subventrikulärzone
TAP	Transitory Amplyfying Progenitor
TBS	Tris Buffered Saline
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor alpha
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von Willebrand Faktor

# Danksagungen

Zunächst möchte ich natürlich meiner Betreuerin, Frau Dr. Ana Luisa Pina danken, durch die ich auf dieses interessante Thema aufmerksam geworden bin und die mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat. Stets stand sie in ihrer warmherzigen und immer offenen Art mit Rat und Tat zur Seite, wenn Dinge unklar waren und Probleme gelöst werden mussten.

Weiterhin danke ich dem Lehrstuhlinhaber der Neurochirurgischen Abteilung der Universitätsklinik Regensburg, Herrn Prof. Dr. A. Brawanski, dafür, dass er die Durchführung meiner Arbeit ermöglicht hat.

Nicht zuletzt möchte ich den beiden MTAs der neurochirurgischen Arbeitsgruppe, Marion Kubitza und Eva-Maria Störr, dafür danken, dass sie mich in die Techniken der Aufbereitung und immunhistochemischen Färbung von Rattenhirnen eingeführt haben und allzeit mit einem guten Ratschlag und Verbesserungsvorschlägen zur Stelle waren. Ohne sie wäre die Verwirklichung dieser Arbeit wirklich nicht möglich gewesen.

Ganz besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Martin Proescholdt, der kurz vor Abschluss der Arbeit besonders durch seine fachlichen und wissenschaftlichen Ratschläge eine Abrundung dieser Dissertation erst ermöglichte und Herrn PD Dr. Felix Schlachetzki, der sich freundlicherweise für die Abfassung des Zweitgutachtens meiner Arbeit zur Verfügung stellte.

Als letztes möchte ich noch allen Mitgliedern der neurochirurgischen Arbeitsgruppe im Forschungsbau H3 danken, die mir durch ihre freundliche Aufnahme und ihren Umgang ein angenehmes Arbeitsklima ermöglichten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name Michael Gerhard Ertl  
Geburtstag 28.12.1980  
Geburtsort Augsburg  
Familienstand ledig  
Adresse Ambergerstr. 6, 92421 Schwandorf  
Telefon 0176 / 2 33 90 68 5  
Email [Michael.Ertl@medbo.de](mailto:Michael.Ertl@medbo.de)

## Schulbildung

Gymnasium bei St. Stephan 1991-2000  
Abiturnote: 1,2

## Berufsausbildung

Ausbildung zum *Rettungssanitäter* beim Malteser Hilfsdienst e.V. in Regensburg (02/2002- 08/2002)

## Hochschulausbildung

Studium der *Rechtswissenschaften* an der Universität Regensburg  
(WS 2001/2002 – SS 2002)  
Studium der *Humanmedizin* an der Universität Regensburg seit Oktober 2002  
Abschluss des Studiums am 07.11.2008  
1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note „gut“  
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: Note „gut“

## Promotion

*Experimentelle Doktorarbeit* in der Neurochirurgie seit Oktober 2004.

Thema: PEDF und seine Auswirkungen auf die Proliferation und Differenzierung von neuronalen Stammzellen in der Subventrikulärzone und im Hippocampus des adulten Nagergehirns.

## Wissenschaftliche Tätigkeiten

1. *Studentische Hilfskraft* am Institut für Anatomie an der Universität Regensburg 10/2003 – 02/2004
2. *Studentische Hilfskraft* am Institut für Neurologie in der Schlaganfallgruppe von PD Dr. Schlachetzki an der Universitätsklinik Regensburg seit 11/2006 – 09/2007

## Arbeitserfahrungen

Zivildienst Pflegedienst auf der chirurgischen Station des Evangelischen Diakonissenhauses Augsburg.  
(09/2000 – 08/2001)

Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst e.V. (seit 08/2002)

Assistenzarzt seit 01.01.2009 angestellt als Assistenzarzt an der *Klinik und Poliklinik für Neurologie* der Universität Regensburg bei *Prof. Dr. Ulrich Bogdahn*

## Famulaturen

Innere Medizin Praxisfamulatur bei einem niedergelassenen Internisten (Gastroenterologen) in Augsburg (02/2005 – 04/2005)

Anästhesie

Neurochirurgie

Neurologie

im "Evangelischen Krankenhaus" in Regensburg  
(09/2005)

am Uniklinikum Regensburg (02-03/07)

1. am **Concord Repatriation Hospital** in Sydney/  
Australien (02/2006 – 03/2006)

2. auf der *neurologischen Intensivstation* am  
Bezirkskrankenhaus (09/2006)

### Praktisches Jahr

Herz-Thorax-Chirurgie

am **Mount-Sinai-Hospital** in New York City/ USA  
(27.08.-21.10.2007)

am Klinikum Weiden (11.02.-06.04.2008)

Allgemeinchirurgie

Neurologie

1. am **Montréal Neurological Institute** in  
Montréal/Kanada (22.10.-16.12.2007)

2. am Bezirkskrankenhaus Regensburg  
(17.12.2007-10.02.2008)

Innere Medizin

am Klinikum Donaustauf (07.04.-09.05.2008)

am Uniklinikum Regensburg (12.05.-27.07.2008)

### Außerstudentisches Engagement

Ehrenamtliche Tätigkeiten

Langjährige Tätigkeit beim Malteser Hilfsdienst in der  
Behindertenbetreuung, bei Sanitätsdiensten und im  
Rettungsdienst

Fachschaft

Fachschaftsvorstand und Schatzmeister der  
„Fachschaft Humanmedizin der Universität  
Regensburg e.V.“

Stipendium

Fachforumssprecher der Hanns-Seidel-Stiftung für den  
Bereich Medizin  
der Hanns-Seidel-Stiftung (seit März 2005)

### Besondere Kenntnisse

Sprachen

*Englisch:* fließend in Sprache und Schrift

Teilnahme am Kurs "Englisch für

Naturwissenschaftler"

*Italienisch* und *Französisch:* Basiskenntnisse

*Latein* und *Altgriechisch:* Schulkenntnisse

### Hobbies und Interessen

Sport

Marathonlauf (Teilnahme am Regensburg Marathon  
2004, 2005 und am Berlin Marathon 2006)

Breitensportlich Triathlon (Mitgliedschaft im Verein  
TriStar Regensburg)

Badminton, Volleyball, Squash

Ehemals Turniertanzen

Darüber hinaus

Literatur besonders Geschichts- und Kriminalromane  
Medien und Film, Theater, Ballet, Kunst, Architektur